

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE BENZILPENICILINA PROCAÍNICA NA
TERAPÊUTICA DE MAMITES POR *STREPTOCOCCUS UBERIS*

RITA BRONZE VINHA

ORIENTADOR: Doutor José Ricardo Dias
Bexiga

TUTOR: Doutor Manuel de Oliveira
Pinheiro

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE BENZILPENICILINA PROCAÍNICA NA
TERAPÊUTICA DE MAMITES POR *STREPTOCOCCUS UBERIS*

RITA BRONZE VINHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE: Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR: Doutor José Ricardo Dias Bexiga

TUTOR: Doutor Manuel de Oliveira Pinheiro

2020

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Rita Bronze Vinha

Título da Tese ou
Dissertação: Utilização intramamária de benzilpenicilina procaínica na terapêutica de
mamites por *Streptococcus uberis*

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas
públicas): 2020

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

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

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 21 de julho de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Rita Bronze Vinha

Agradecimentos

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por serem cruciais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, por permitirem que realize todos os meus sonhos e por serem os meus pilares incondicionalmente.

Aos meus avós, por compartilharem todos os meus grandes momentos, por todo o orgulho e por compreenderem que mesmo distante estou sempre presente.

À minha tia Celeste, ao tio Horácio e ao meu primo Gonçalo, por terem sido o meu porto de abrigo em Lisboa e me acolherem de uma forma indescritível.

À minha amiga Rita, por nunca ter sucumbido ao cansaço de me aturar, por estar lá nos choros e nas gargalhadas, por ser a companheira de todas as aventuras e por toda a cooperação na realização desta dissertação.

Aos amigos que nunca esquecerei, ao maravilhoso Quinteto – Rita Silva, Rita Rodrigues, Inês e Pedro – por todas as loucuras; à Jessica, à Rita Diogo, à Cláudia Verdial, ao Vinhas, ao Tó Jó e ao Eloy que fizeram deste percurso uma bonita viagem; e à Cláudia Lobo, ao Afonso e ao João pela confiança que depositaram em mim e pela cumplicidade.

Às minhas amigas de sempre, Joana e Margarida, por me apoiarem desde que me lembro e estarem sempre lá seja qual for a distância que nos separe.

A toda a equipa da Proleite, por tudo o que me ensinaram, pela amizade, boa disposição e verdadeiro profissionalismo que jamais esquecerei e por me terem feito sempre sentir em casa.

Ao Professor Ricardo Bexiga, pela incondicional disponibilidade, excelente orientação e sempre bem-disposta forma como ajudou na elaboração desta dissertação.

À Dr.^a Inês Rebelo, que foi fundamental em todo este processo, pela cooperação desde a conceção do projeto a todo o tempo despendido para a sua concretização. Por toda a amizade e alegria no trabalho e pela generosidade extraordinária que demonstrou na transmissão de conhecimentos.

Utilização intramamária de benzilpenicilina procaínica na terapêutica de mamites por *Streptococcus uberis*

Resumo

Streptococcus uberis é um agente etiológico de mamites, ubiqüitário no ambiente das vacas sendo considerado ambiental, porém com alguma componente contagiosa. Atualmente, é considerado um dos agentes mais preocupantes, que produz mamites tanto subclínicas como clínicas graves e, frequentemente, associadas a contagens de células somáticas (CCS) elevadas. Estas infeções acarretam uma grande dificuldade no processo de cura e as medidas clássicas de controlo de mamites não se demonstram eficazes contra este agente, pois dispõe de vários fatores de virulência. Deste modo, o estudo apresentado visa avaliar a eficácia de várias terapêuticas à base de benzilpenicilina procaínica intramamária (IMM), com diferentes durações, e a vantagem de associar um antibiótico sistémico, neste caso a ampicilina.

De forma a proceder a este trabalho, desde dia 16 de setembro de 2019 até 18 de fevereiro de 2020, foram recolhidas amostras de leite de vacas com sinais de mamite, tais como quartos mamários edemaciados e/ou tumefactos e/ou alterações no leite, de várias explorações leiteiras pertencentes à Proleite. Todas as vacas identificadas microbiologicamente com *S. uberis* foram submetidas a um dos três protocolos terapêuticos em estudo: benzilpenicilina procaínica IMM durante sete dias, uma terapia combinada com ampicilina intramuscular durante cinco dias e outra apenas com administração IMM num período de cinco dias.

Assim, através das taxas de cura clínica, analisadas pela CCS, foi perceptível que tanto a terapia combinada (57,1%) como o tratamento IMM de sete dias (54,5%) proporcionaram uma taxa de cura razoável, ao contrário da terapêutica IMM de cinco dias (25%). A fase produtiva do animal poderá ter tido alguma influência nas taxas de cura atingidas, já que se verificou que apenas 42,1% das vacas múltíparas atingiu a cura clínica. Também a duração destas infeções poderá ter sido limitante, uma vez que somente 35,7% das vacas com IMM prolongada apresentaram cura clínica. Após a aplicação de qualquer protocolo terapêutico foi visível uma diminuição nas células somáticas presentes no leite das vacas afetadas, todavia estas mantêm-se em valores elevados.

Quanto à epidemiologia, confirmou-se que *S. uberis* é bastante prevalente (5,8%), está associado a elevados valores de células somáticas e foi, também, perceptível que 77,3% destas mamites ocorrem num período próximo da secagem, que os animais com uma fase produtiva mais avançada são mais suscetíveis (86,4%) e que são normalmente infeções já subclínicas e de longa duração (63,5%).

Palavras-Chave

Streptococcus uberis; benzilpenicilina procaínica; ampicilina; mamites; terapêutica

Intramammary use of procaine benzylpenicillin in the treatment of *Streptococcus uberis* mastitis

Abstract

Streptococcus uberis is an etiologic agent of mastitis, that is ubiquitous in the environment of cows, so it is considered as an environmental agent, however with a contagious component. Currently, it is considered one of the most worrying agents, which produces both subclinical and severe clinical mastitis, frequently associated with high somatic cell counts (SCC). These infections are known by the problematic healing process and most of the classic control measures do not demonstrate any use against this agent, because it can exhibit several virulence factors. In this way, the study presented aims to evaluate the effectiveness of various therapies based on intramammary (IMM) procaine benzylpenicillin, with different durations and to know the advantage of associating a systemic antibiotic, in this case ampicillin.

In order to proceed with the study, from September 16, 2019 to February 18, 2020, milk samples from cows with signs of mastitis, such as swollen teats and/or changes in milk, from various types of dairy farms belonging to Proleite, were collected. All infections microbiologically identified with *S. uberis* were subjected to one of the three therapeutic protocols under study: procaine benzylpenicillin IMM for seven days, a combination therapy with intramuscular ampicillin for five days and another one with only IMM administration for five days.

Thus, through the clinical cure rates, analyzed by the SCC, it was shown that both, the combination therapy (57,1%) and the seven-day IMM treatment (54,5%), had a reasonable cure rate, in contrast to the five-day IMM therapy (25%). The animal's productive stage may have some influence on the cure rates achieved, which has been verified because only 42,1% of the multiparous cows achieved the clinical cure. The duration of these infections may also have been a limitation, since only 35,7% of the cows with prolonged IMI showed a clinical cure. After the application of any therapeutic protocol, a reduction in the somatic cells present in the milk of the affected cows was detected, however these remain in high values.

Regarding epidemiology, it was confirmed that it is a very prevalent agent (5,8%) and that is associated with high values of somatic cells. It was also noticeable that 77,3% of the *S. uberis* mastitis occurred close to the drying period, that animals with a more advanced productive stage are more susceptible (86,4%) and that these infections are mostly already subclinical and long lasting (63,5%).

Keywords

Streptococcus uberis; procaine benzylpenicillin; ampicillin; mastitis; therapy

Índice

1. Relatório de Estágio	1
2. Introdução	2
3. Revisão Bibliográfica	2
3.1. Mamites	2
3.1.1. Patogênese	3
3.1.2. Tipos	4
3.2. <i>Streptococcus uberis</i>	5
3.2.1. Fisiopatologia e Epidemiologia	5
3.2.2. Fatores de Virulência	6
3.2.3. Sinais Clínicos	8
3.2.4. Métodos de Diagnóstico	9
3.2.4.1. Contagem de Células Somáticas	9
3.2.4.2. Teste de Condutividade Elétrica	11
3.2.4.3. Cultura Bacteriológica	11
3.2.4.4. Testes Moleculares	13
3.2.5. Controle	13
3.2.6. Terapêutica	15
3.2.6.1. Fatores Limitantes de Cura	17
3.2.7. Resistência a Antibióticos	17
3.3. Benzilpenicilina Procaínica	19
3.3.1. Farmacocinética	20
3.3.2. Farmacodinamia	20
3.3.3. Aplicações em Mamites	21
3.4. Ampicilina	21
3.4.1. Farmacocinética	21
3.4.2. Farmacodinamia	22
3.4.3. Aplicações em Mamites	22
4. Objetivos	23
5. Materiais e Métodos	23
5.1. Caracterização das Explorações	23
5.2. Caracterização das Amostras	24
5.3. Protocolo Terapêutico	27
5.4. Análise Estatística	28
6. Resultados	28
6.1. Epidemiologia	28
6.2. Terapêutica	34
7. Discussão	43
7.1. Epidemiologia	43

7.2. Protocolos Terapêuticos	47
7.3. Limitações do Estudo e Sugestões	50
8. Conclusão	51
9. Referências Bibliográficas	53
11. Anexos	59
Anexo 1 - Esquema figurativo da metodologia do TCM (Adaptado de Blowey and Edmondson 2010)	59
Anexo 2 - Relatório emitido pelo sistema Vitek 2 Gram Positivo após identificação do agente	60
Anexo 3 – Tabelas de contingência de base dos vários testes estatísticos elaborados (teste exato de Fisher).....	61

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do desenvolvimento de uma mamite. 1 – Invasão do úbere através do teto; 2 – Multiplicação do agente; 3 – Fagocitose por parte dos neutrófilos (Adaptado de Constable et al. 2017)	3
Figura 2 - Princípio do teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco (Fonte: Machado e Gales 2008)	18
Figura 3 - Dois exemplos de explorações alvo do estudo. (A): Exploração de grandes dimensões. (B): Exploração de caráter familiar.	24
Figura 4 - Sementeiras em estria em placa de agar sangue (1) e MacConkey (2) após incubação.....	25
Figura 5 - Carta do Vitek gram positivo, após processo de identificação.	26
Figura 6 - Placa de Müller-Hinton Agar resultante de um TSA pelo método de Kirby-Bauer.	26
Figura 7 - Exemplo de um relatório do resumo mensal do CL de uma exploração em estudo (retirado de Bovinfor®).	27

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Interpretação e leitura do TCM, demonstrando a correspondência aproximada com a CCS (Adaptado de Ruegg 2003; Smith 2015 e Constable et al. 2017).	10
Tabela 2 - Valores das CCS encontrados nos meses anteriores ao diagnóstico de mamite por <i>S. uberis</i>	33
Tabela 3 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com os diferentes protocolos terapêuticos utilizados.	35
Tabela 4 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com a paridade do animal.	38
Tabela 5 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre a resposta terapêutica e a duração da infecção.	39

Tabela 6 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com as diferentes fases de lactação do animal.....	40
Tabela 7 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre a resposta à terapêutica e o tempo de atraso na avaliação dos resultados.	41
Tabela 8 - Valores das CCS encontrados após a terapêutica consoante os diferentes tempos de atraso de análise dos resultados.	42
Tabela 9 - Comparação das prevalências de <i>S. uberis</i> em vacas diagnosticadas com mamite, em diferentes estudos e países.	44
Tabela 10 - Comparação das percentagens de resistência aos antimicrobianos da classe das penicilinas, apresentadas por <i>S. uberis</i> em vários estudos.....	45

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição dos vários tipos de ordenha presentes nas explorações da Proleite.	24
Gráfico 2 - Prevalência dos vários agentes etiológicos identificados em amostras de leite, relativas a vacas, assistidas pela Proleite, com sinais de mamite no ano de 2019.	28
Gráfico 3 - Prevalência de mamicas por <i>S. uberis</i> ao longo do tempo, diagnosticadas em explorações assistidas pela Proleite.....	29
Gráfico 4 - Padrão de suscetibilidades dos isolados de <i>S. uberis</i> identificados em 2019, nas explorações assistidas pela Proleite.....	29
Gráfico 5 - Distribuição dos animais com infeção por <i>S. uberis</i> por cada fase de lactação...30	
Gráfico 6 - (A) Distribuição de vacas primíparas e múltiparas identificadas com infeção por <i>S. uberis</i> . (B) Distribuição de animais com infeção por <i>S. uberis</i> por cada fase produtiva...31	
Gráfico 7 - Distribuição dos casos estudados por número de quartos mamários afetados. ...32	
Gráfico 8 - Análise das CCS aquando do diagnóstico de mamite por <i>S. uberis</i>32	
Gráfico 9 - Distribuição dos casos diagnosticados com <i>S. uberis</i> consoante a duração de infeção.33	
Gráfico 10 - Comparação dos valores das CCS no leite nos meses anteriores ao diagnóstico de mamite por <i>S. uberis</i>34	
Gráfico 11 - Frequências relativas de cura clínica nos vários protocolos terapêuticos em estudo.35	
Gráfico 12 - Análise das CCS após cada protocolo terapêutico utilizado.....36	
Gráfico 13 - Comparação entre as CCS aquando do diagnóstico e após terapêutica, nos vários protocolos em estudo.....37	
Gráfico 14 - Taxa de cura clínica em relação à paridade do animal.....38	

Gráfico 15 - Taxa de cura clínica em relação à duração da infecção.....	39
Gráfico 16 - Taxa de cura clínica em cada fase de lactação.....	39
Gráfico 17 - Comparação dos valores das CCS no leite ao longo de toda a evolução da mamite por <i>S. uberis</i> e posterior terapêutica.	40
Gráfico 18 - Taxa de cura clínica obtida consoante o tempo de atraso na análise dos resultados.....	41
Gráfico 19 - Comparação dos valores das CCS encontradas após a terapêutica consoante os diferentes tempos de atraso de análise dos resultados.	42

Lista de Abreviaturas

°C – graus *Celsius*

µg - microgramas

AINE – anti-inflamatório não esteroide

BAC – *biofilm adhesion componente*

CCS – contagem de células somáticas

Cl⁻ – cloro

CL – Contraste leiteiro

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB – concentração mínima bactericida

CMI – concentração mínima inibitória

CS – células somáticas

DEL – dias em leite

DNA – ácido desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IIM – infeção intramamária

IM – intramuscular

IMM – intramamário

K⁺ – potássio

Kg – quilogramas

mg – miligramas

mL – mililitros

Na⁺ – sódio

NaCl – cloreto de sódio

PCR – polymerase chain reaction

SC – subcutâneo

S. uberis – *Streptococcus uberis*

Staph. aureus – *Staphylococcus aureus*

Staph. CN – *Staphylococcus* coagulase negativos

Strept. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

Strept. dysgalactiae – *Streptococcus dysgalactiae*

SUAM – molécula de adesão de *S. uberis*

TCM – teste californiano de mamites

TSA – teste de sensibilidade a antibióticos

1. Relatório de Estágio

O estágio curricular decorreu ao longo de cerca de 4 meses, desde 16 de setembro de 2019 a 24 de janeiro de 2020, e foi realizado na Proleite – Cooperativa de Produtores de Leite do Centro Litoral, incidindo, predominantemente, em bovinos leiteiros. Durante este período, foram acompanhadas diariamente atividades das diversas áreas de atuação da cooperativa, como clínica, reprodução, sanidade, qualidade de leite e aconselhamento/acompanhamento de gestão de explorações. Além de bovinos leiteiros, a prática veterinária incidiu também em bovinos com aptidão para carne, ovinos e suínos, porém numa proporção muito inferior.

Na área de clínica, tanto médica, como cirúrgica, procedeu-se, de uma forma geral, à elaboração de exames físicos de diagnóstico, administrações farmacológicas, recolha de amostras para exames complementares, intervenções cirúrgicas e assistência a partos. Especificamente, a nível metabólico, foram acompanhados vários casos de cetose e de hipocalcémia, no trato respiratório destacaram-se casos de pneumonia, no aparelho digestivo, situações de deslocamento de abomaso à esquerda, hipomotilidade ruminal e diarreias, no aparelho reprodutor foram frequentemente acompanhados casos de metrite e retenção placentária e no que toca à saúde do úbere destacam-se as mamites.

Palpações retais e exames ecográficos foram realizados no âmbito do controlo reprodutivo, desempenhando diagnósticos de gestação, assim como deteções e sincronizações de cio, através de protocolos hormonais. Quanto à sanidade animal, as atividades consistiram em intervenções profiláticas, tais como vacinação e desparasitação de efetivos bovinos, e em colheita e envio de amostras de sangue e de leite para serologia. Foram, ainda, analisados contrastes leiteiros, testes de sensibilidade a antibióticos e relatórios de identificação de agentes no leite, com o objetivo de proporcionar um acompanhamento na área da qualidade de leite.

Com vista a elaborar o estudo abordado na presente dissertação, no decorrer de todo o estágio, foi possível implementar vários protocolos terapêuticos para mamites identificadas com o agente etiológico *S. uberis* e recolher os respetivos resultados.

2. Introdução

As perdas económicas nas explorações leiteiras devem-se maioritariamente a mamites (Gomes et al. 2016), tendo sido implementadas várias medidas de controlo das mesmas, que resultaram num declínio da sua incidência. Uma correta rotina de ordenha com boa manutenção dos equipamentos, desinfeção dos tetos e higiene do ordenhador, o tratamento desta doença com recurso a antibióticos e o refugio de animais persistentemente infetados, reduziu substancialmente a carga microbiana do leite no que toca a agentes contagiosos, diminuindo, assim, o risco de novas infeções. Porém, o controlo de mamites de carater ambiental continua a ser um desafio (Bradley 2002; Constable et al. 2017; Wente et al. 2019).

Streptococcus uberis é um agente patogénico ubiqüitário no ambiente das vacas sendo, portanto, considerado ambiental, no entanto existem determinadas estirpes que se comportam como contagiosas (Archer et al. 2017; Klaas e Zadoks 2018). Atualmente, representa um dos agentes mais preocupantes, uma vez que apresenta uma prevalência significativa (Shome et al. 2012), produz mamites tanto subclínicas como clínicas graves (Zadoks et al. 2003; Kromker et al. 2014) associadas a contagens de células somáticas elevadas e acarreta uma grande dificuldade no processo de cura (Douglas et al. 2000). As medidas clássicas de controlo de mamites não se demonstram eficazes contra este agente, que além de ser ambiental, possui inúmeros fatores de virulência (Bradley 2002; Wente et al. 2019).

Assim, é considerado um motivo de frustração tanto para a medicina veterinária como para o setor leiteiro, pois os tratamentos aplicados não demonstram grandes resultados e o facto de diminuir a produção de leite, induzir ao refugio prematuro de animais, rejeição do leite com elevadas contagens de células somáticas (Heikkilä et al. 2018) e de aumentar os custos em serviços veterinários representa um grande impacto económico nas explorações (Rato et al. 2008; Constable et al. 2017).

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Mamites

As mamites são definidas como uma reação inflamatória do parênquima da glândula mamária e caracterizadas por uma grande variedade de alterações patológicas no tecido, assim como físicas e químicas no leite (Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Estas podem ser consequência, na maior parte dos casos, de uma infeção por bactérias, algas ou leveduras, no entanto infeções virais e agressões físicas ou químicas também pertencem à etiologia das mamites, porém com menor frequência (Bradley 2002). Como são

responsáveis por grande parte das perdas económicas em explorações leiteiras, representam umas das maiores preocupações do setor leiteiro.

3.1.1. Patogénese

Geralmente, as mamites desencadeiam-se em três fases. A primeira consiste na invasão da glândula mamária por microrganismos, geralmente através do teto. Seguidamente estes colonizam a glândula mamária, multiplicam-se de uma forma célere e disseminam-se por todo o úbere provocando uma infeção. Por último, instala-se a inflamação, visto que existe um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, uma mobilização massiva de neutrófilos polimorfonucleares recrutados através de mediadores inflamatórios emitidos pelos leucócitos e células epiteliais locais (Figura 1; Kehrlí e Shuster 1994; Bradley e Green 2005; Constable et al. 2017).

Com a persistência da infeção, os ductos da glândula mamária apresentam-se bloqueados, provocando a retenção de leite que induz nas células secretoras um estado não produtivo e culmina na atrofia dos alvéolos. Posteriormente, poderá desenvolver-se uma destruição completa e substituição das estruturas alveolares por tecido conjuntivo como mecanismo de defesa por parte do organismo. Deste modo, a progressão da doença leva a um aumento das células somáticas presentes no leite e a uma permanente redução na produção de leite (Bogni et al. 2011).

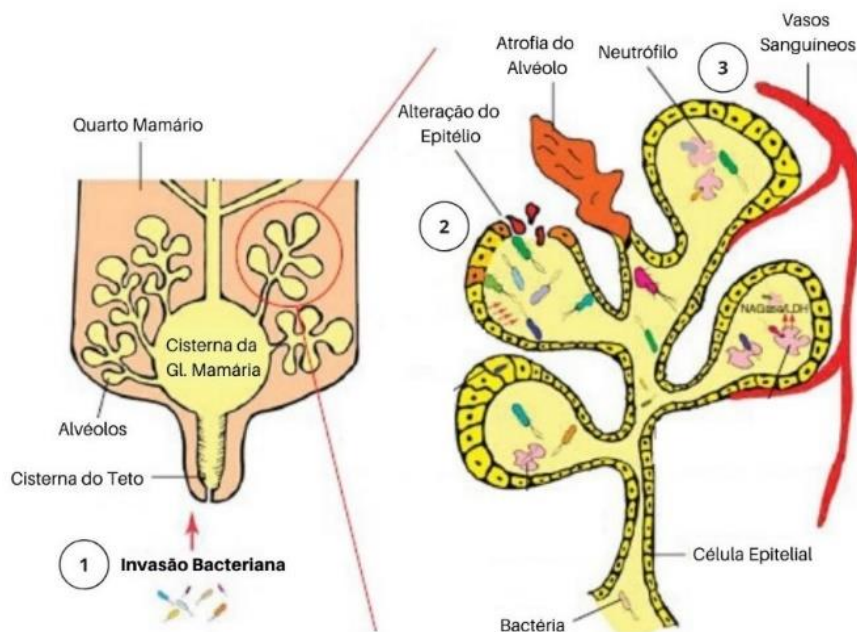


Figura 1 - Representação esquemática do desenvolvimento de uma mamite. 1 – Invasão do úbere através do teto; 2 – Multiplicação do agente; 3 – Fagocitose por parte dos neutrófilos (Adaptado de Constable et al. 2017)

3.1.2. Tipos

A detecção de uma mamite bovina depende da resposta inflamatória desencadeada, que por sua vez é condicionada pelo agente etiológico, idade, raça, capacidade imunitária e fase de lactação. É, então, possível assumir uma classificação quanto à severidade da mesma em clínica, subdividindo-se em aguda e crônica, e subclínica (Blowey e Edmondson 2010; Bogni et al. 2011).

- Mamite Clínica: inflamação do úbere visível, ou seja, com produção anormal de leite, como por exemplo, leite com coágulos, flocos ou secreções serosas (aparência aquosa), e demonstração ou não de sinais clínicos. Estes podem ser locais, tais como, dor, vermelhidão, edema e tumefação dos quartos afetados, ou sistêmicos: febre, perda de apetite e desidratação (Bogni et al. 2011; Smith 2015). Normalmente, este tipo de mamite é acompanhado de grandes decréscimos na produção de leite (Constable et al. 2017) e de aumentos significativos das células somáticas no leite (De Haas et al. 2002; Roth e Wolfenson 2016).
 - Aguda: inflamação de curta duração com sinais clínicos severos (Blowey e Edmondson 2010).
 - Crônica: inflamação persistente da glândula mamária com uma severidade moderada (Blowey e Edmondson 2010; Bogni et al. 2011). São mamites refratárias à terapêutica, provocando grandes alterações no parênquima.
- Mamite Subclínica: infecção do úbere com ausência de sinais locais ou sistêmicos visíveis (Blowey e Edmondson 2010), requerendo métodos auxiliares de diagnóstico para a sua detecção, como é o caso da contagem de células somáticas (CCS) e da medição da condutividade elétrica no leite, assim como do teste californiano de mamites (Bogni et al. 2011). Têm duração variável, podendo ser uma via de infecção para o restante efetivo (Smith 2015), porém o aumento das células somáticas no leite e o decréscimo na produção não são tão pronunciados como em mamites clínicas (Roth e Wolfenson 2016; Constable et al. 2017). Consoante o tipo de agente etiológico, estas mamites podem resolver-se espontaneamente ou evoluir para mamites clínicas (Lévesque 2004).

Existem várias etiologias envolvidas no aparecimento de uma mamite, sendo os agentes infecciosos a mais comum. No que concerne à epidemiologia, estas infecções podem, então, ser caracterizadas como contagiosas e ambientais (Smith e Hogan 1993; Constable et al. 2017).

- Mamite Contagiosa: associada a agentes que apresentam boas condições de sobrevivência no hospedeiro, especialmente a nível do úbere, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis* (Bradley 2002; Bogni et al. 2011; Gomes et al. 2016; Constable et al. 2017). Tem como

veículos de transmissão máquinas de ordenha, mãos dos operadores e panos ou papéis de limpeza dos tetos, já que a sua transmissão ocorre de animal para animal. Estas mamites provocam, geralmente, infecções subclínicas por períodos alongados (Fox e Gay 1993; Bradley 2002; Bogni et al. 2011; Constable et al. 2017).

- Mamite Ambiental: provocada por agentes que se encontram no meio ambiente do animal, como no material de cama, água ou fezes. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são alguns dos causadores deste tipo de mamites, não estando adaptados à sobrevivência no hospedeiro (Bogni et al. 2011; Gomes et al. 2016). Qualquer época da vida do animal – período de lactação, período seco e peri-parto – é suscetível ao aparecimento de mamites deste género, que normalmente têm curta duração e carácter clínico (Smith e Hogan 1993; Bradley 2002; Constable et al. 2017).

Alguns agentes patogénicos apresentam duplo carácter, sendo considerados ambientais com componente contagiosa, como é o caso das bactérias *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (Bogni et al. 2011).

3.2. *Streptococcus uberis*

3.2.1. Fisiopatologia e Epidemiologia

A bactéria *Streptococcus uberis* é um coco Gram-positivo anaeróbio aerotolerante (Kromker et al. 2014), apresentando as seguintes características: catalase negativo, oxidase negativo e esculina positivo (capacidade de hidrolisar a esculina; Constable et al. 2017). É considerado um agente ambiental, contudo dispõe de mecanismos de sobrevivência e persistência na glândula mamária que lhe dão um carácter contagioso. Esta vertente deve-se à existência de estirpes com capacidade para produzir biofilme e para colonizar o tecido epitelial do teto, entre outros mecanismos, originando mamites crónicas que são fonte de contaminação e infeção para outras vacas (Zadoks et al. 2003; Santos et al. 2007; Archer et al. 2017; Klaas e Zadoks 2018; Wente et al. 2019).

Encontrado, fundamentalmente, nas camas de palha, um substrato orgânico favorável à sua replicação, foi também isolado em várias partes do corpo da vaca (boca, vulva, tetos, pele do abdómen e feridas), assim como no solo e pastagens (Zadoks et al. 2003; Pullinger et al. 2006; Klaas e Zadoks 2018). É, portanto, considerado ubiqüitário no ambiente destes animais, uma vez que se encontra nas fezes e na mucosa do trato digestivo, disseminando-se por todo o meio (Kromker et al. 2014; Smith 2015; Constable et al. 2017; Wente et al. 2019).

A infeção intramamária ocorre através da entrada da bactéria pelo canal do teto e consequente multiplicação no interior do úbere (Lopez-Benavides et al. 2007). Assim, a contaminação tanto pode ocorrer no início da ordenha, aquando da colocação das tetinas –

por entradas de ar que transportam as bactérias para o interior –, como durante o período de repouso da vaca (Zadoks et al. 2003; Wente et al. 2019). Outra forma de transmissão possível é por intermédio de novilhas que ao “mamar” nos tetos das coabitantes inserem o agente, que está presente na cavidade oral, no úbere (Kromker et al. 2014). Deste modo, provoca um grande espectro de infeções, desde clínicas a subclínicas persistentes e até crónicas, podendo ter uma severidade média ou alta (Wente et al. 2019).

Os períodos mais suscetíveis a infeção por *S. uberis* são o periparto e a secagem (Lopez-Benavides et al. 2007), já que existem alterações nas secreções mamárias, o agente tem a capacidade de se agregar às lactoferrinas existentes no úbere nesta altura e o sistema imunitário do hospedeiro está comprometido (Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Deste modo, as mamites surgem, maioritariamente, no início da lactação ou até mesmo no fim do período seco e são acompanhadas de uma rápida afluência de neutrófilos que se apresentam ineficazes na prevenção da multiplicação desta bactéria, resultando em mamites subclínicas persistentes e com elevadas contagens de células somáticas (Khan et al. 2003; Smith 2015). Já as infeções clínicas são, frequentemente, observadas durante a lactação (Khan et al. 2003).

Entre os vários fatores de risco para este tipo de infeções estão a idade dos animais, sendo que vacas com mais de quatro lactações apresentam maior vulnerabilidade (Jayarao et al. 1999; Zadoks, Allore, Barkema, Sampimon, Wellenberg, et al. 2001; Kromker et al. 2014); o histórico de mamite, uma vez que quando existem episódios de mamite anteriores por qualquer agente, mesmo após cura, há um maior risco de infeção por esta bactéria (Lopez-Benavides et al. 2007), e as condições de pastagem, áreas sombrias, com má drenagem, lamacentas e com elevado aglomerado de animais representam um risco superior (Constable et al. 2017).

3.2.2. Fatores de Virulência

De forma a obter acesso à glândula mamária, colonizar o tecido e ficar aderente ao mesmo, *S. uberis* desenvolveu uma variedade de características que lhe permitem resistir aos mecanismos inatos de defesa do organismo e a tentativas de eliminação. Contudo, estes fatores de virulência não estão totalmente descobertos e caracterizados, podendo variar entre as várias estirpes desta bactéria (Kromker et al. 2014).

No processo de estabelecimento da infeção, este agente recorre à internalização nas células epiteliais mamárias. Assim, a sua localização intracelular permite uma evasão ao sistema imunitário e também a alguns procedimentos antimicrobianos. Os métodos deste agente para atingir este posicionamento são aos seguintes:

- Capacidade de formar hialuronidase livre, decompondo o ácido hialurónico em oligossacarídeos, o que incapacita a formação de um epitélio contínuo e facilita a colonização e distribuição pelo tecido mamário (Kromker et al. 2014).
- Presença de ativadores de plasminogénio específicos na superfície celular da bactéria, proteínas PauA e PauB (Leigh 1999; Khan et al. 2003). Estes promovem a conversão de plasminogénio em plasmina – enzima proteolítica que desempenha um papel fundamental na degradação de fibrina e de outras proteínas da matriz extracelular e também no processo de remodelação dos tecidos –, favorecendo então a penetração nas células. Desempenham, ainda, a ativação de plasminogénio endógeno, presente no leite, que resulta na libertação de péptidos utilizados como aminoácidos essenciais na nutrição de *S. uberis* (Segura e Gottschalk 2004; Shome et al. 2012).

Durante o período seco, as vacas dispõem de um componente bacteriostático inespecífico na glândula mamária disponibilizado pelas lactoferrinas. São glicoproteínas quelantes de ferro produzidas pelas células epiteliais e pelos leucócitos que, na presença de bicarbonato, sequestram os iões de ferro livres no leite (Patel et al. 2009). A sua ação bacteriostática deve-se, fundamentalmente, à capacidade de evitar a multiplicação de algumas bactérias, por exemplo *Staphylococcus* e coliformes, que necessitam de elevados teores de ferro para se multiplicar (Fang e Oliver 1999). As lactoferrinas retêm os iões de ferro e facilitam a fagocitose, já que induzem a produção de radicais superóxido utilizados pelos neutrófilos na degradação destes agentes (Kawai et al. 2007). Também participam na modulação e regulação da função dos macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Fang e Oliver 1999).

Contudo, *S. uberis* demonstra uma capacidade de interação com as lactoferrinas através de proteínas da sua superfície celular denominadas de moléculas de adesão de *Streptococcus uberis* (SUAM; Patel et al. 2009; Shome et al. 2012). Estas permitem a ligação ao recetor destas glicoproteínas presentes nas células epiteliais mamárias, implicando não só a utilização de ferro para o seu desenvolvimento (Kromker et al. 2014), como uma resistência à sua ação antimicrobiana e utilização das mesmas para aderir e proceder à internalização no epitélio da glândula mamária (Fang e Oliver 1999; Santos et al. 2007; Patel et al. 2009; Almeida et al. 2015). Portanto, também durante a secagem este agente patogénico dispõe de um escape aos mecanismos de defesa do hospedeiro, além dos já referidos.

Após colonização, *S. uberis* desempenha igualmente técnicas de defesa contra a sua eliminação. Uma delas é a formação de cápsulas de ácido hialurónico que impedem a fagocitose por parte dos neutrófilos, através do bloqueio dos recetores de superfície das células fagocitárias (Segura e Gottschalk 2004) e conseqüente inativação dos seus

componentes opsonizantes (Leigh 1999). Outra técnica, é o facto de possuir capacidade para formação de biofilme – aglomerados de células incluídos numa matriz produzida pelas mesmas, que confere uma tolerância à fagocitose e aos antimicrobianos convencionais (Gomes et al. 2016) – mediada por proteínas. Estas são a alfa-caseína e beta-caseína presentes no leite que quando catabolizadas pela atividade proteolítica de *S. uberis* além de disponibilizarem aminoácidos para a sua nutrição, permitindo uma grande vantagem na sua sobrevivência, também potenciam a sua multiplicação exponencial e assim maximizam a formação de biofilme (Varhimo et al. 2011; Gomes et al. 2016). O transporte de glutamina e o metabolismo de açúcares são igualmente processos que facilitam a geração de biofilme precocemente (Crowley et al. 2011).

Quanto à patogenicidade, este agente é portador do denominado “fator *uberis*” (Khan et al. 2003), que confere a capacidade de proceder a uma hemólise sinérgica através da interação da sua proteína extracelular – co-hemosilina ou fator CAMP – com uma toxina produzida por *Staphylococcus aureus* – esfingomielinase C, uma toxina beta (Segura e Gottschalk 2004).

Portanto, todos estes fatores de virulência demonstrados por *S. uberis*, que lhe permitem invadir as células epiteliais da glândula mamária e escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos agentes terapêuticos de ação antimicrobiana, permitem o estabelecimento de infeções crónicas não responsivas a tratamento (Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

3.2.3. Sinais Clínicos

Apesar de grande parte das mamites por este agente patogénico se apresentarem de forma subclínica, existem várias formas de demonstração desta afeção, sendo que as mamites clínicas apresentam sinais muito variados e inespecíficos. Sistemicamente, poderá demonstrar-se temperatura elevada durante as primeiras 24h e inaptência (Hockett et al. 2000). Já localmente, podem existir alterações no leite, como libertação de secreções mais aquosas com coágulos; no úbere, com quartos quentes, tumefactos e edemaciados e na produção leiteira, estando esta diminuída e com contagens de células somáticas elevadas (Hockett et al. 2000; Constable et al. 2017).

Um caso típico de mamite por *S. uberis*, geralmente, tem início súbito e apresenta os quartos mamários afetados tumefactos e edemaciados, com grandes coágulos brancos no leite e, por vezes, com temperatura corporal elevada (Blowey e Edmondson 2010). Estas infeções têm duração variável, podendo existir umas auto-limitantes e outras que evoluem para crónicas e permanecem durante toda a lactação (Kromker et al. 2014).

3.2.4. Métodos de Diagnóstico

Para um bom acompanhamento da saúde do úbere é imprescindível o uso de métodos de diagnóstico fiáveis e acessíveis (Lam et al. 2009), uma vez que o diagnóstico precoce de mastites é extremamente importante, pois permite a instauração de uma terapêutica atempada, aumentando a taxa de cura e diminuindo o risco de transmissão da infeção a outros animais. Inicialmente, deve fazer-se uma avaliação visual e palpação do úbere para, desta forma, detetar sinais de inflamação, como inchaço, calor, dor e rubor do quarto afetado. Posteriormente, deve ser feita a rejeição dos primeiros jatos de leite, de modo a permitir uma avaliação macroscópica do leite e deteção fácil de possíveis coágulos no mesmo (Lévesque 2004; Lam et al. 2009; Constable et al. 2017).

A contagem de células somáticas e a condutividade elétrica são os métodos de diagnóstico mais frequentes na deteção de inflamação subclínica do úbere, contudo na identificação propriamente dita de *S. uberis*, ou seja, de infeção intramamária, são mais utilizados a cultura bacteriológica e os testes moleculares (Constable et al. 2017), como por exemplo, o *polymerase chain reaction* (PCR).

3.2.4.1. Contagem de Células Somáticas

O leite é constituído por vários tipos de células, como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais mamárias (Pyörälä 2003; Bradley e Green 2005); deste modo, a sua contabilização é expressa sob a designação de contagem de células somáticas (CCS). Esta contagem reflete o estado de saúde da glândula mamária, medindo o risco de ocorrência de alterações não fisiológicas na composição do leite, tais como a afluência de leucócitos para o leite aquando da entrada de microrganismos no úbere (Blowey e Edmondson 2010).

A avaliação das células somáticas pode ser feita com recurso ao teste californiano de mastites (TCM), permitindo uma determinação semi-quantitativa da CCS e, assim, de forma indireta a deteção de mastites subclínicas (Lam et al. 2009; Smith 2015). A relação entre o TCM e a CCS não é muito precisa, mas é possível uma correspondência aproximada (tabela 1; Ruegg 2003; Smith 2015; Constable et al. 2017). Este é um método barato, rápido e simples que pode ser efetuado pelo ordenhador (Blowey e Edmondson 2010). Procedese, então, à adição de um reagente (detergente que permite a lise da parede celular e nuclear, reagindo com o DNA das células, com um indicador de pH – teepol e púrpura de bromocresol, respetivamente) a um volume pequeno de leite previamente colhido para uma placa de teste (anexo 1). A informação de quais as vacas com CCS elevadas e de quais os quartos infetados (Lam et al. 2009) adquire-se através da observação de uma reação (gelificação do leite) na respetiva placa de teste após 15 segundos de homogeneização (Smith 2015; Constable et al. 2017).

Tabela 1 - Interpretação e leitura do TCM, demonstrando a correspondência aproximada com a CCS (Adaptado de Ruegg 2003; Smith 2015 e Constable et al. 2017).

Resultado TCM	Reação Visível	Intervalo de CCS (CS/ml)
Negativo	Mistura mantém-se líquida, sem precipitação.	0 – 200 000
Vestígio	Precipitado ligeiro, que desaparece aquando de homogeneização contínua	150 000 – 500 000
1	Precipitado sem evidência de formação de gel	400 000 – 1 500 000
2	Mistura engrossa rapidamente e dirige-se para o centro da placa de teste	800 000 – 5 000 000
3	Precipitado marcado com formação de gel e superfície convexa	> 5 000 000

Contudo, o TCM possui algumas desvantagens, entre as quais o facto de não permitir obter um valor de CCS exato, de apenas detetar, com clareza, quartos com CCS iguais ou superiores a 400 000 CS/ml de leite e ainda de ser uma técnica dependente da perícia dos seus operadores (Blowey e Edmondson 2010).

Por tudo isto, a medição da CCS é feita, maioritariamente, com recurso a contadores eletrónicos automáticos, disponibilizando com exatidão este valor. O método mais utilizado é o *Fossomatic cell counter*[®] (Blowey e Edmondson 2010) que baseia a sua tecnologia no princípio da citometria de fluxo (Lam et al. 2009), e pode ser aplicado tanto numa amostra de vacas individuais – identificação de mamites subclínicas –, como numa de tanque de leite – estimativa geral da prevalência de IIM da exploração e determinação da qualidade do leite, o que influencia o preço final pago ao produtor, a nível industrial (Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

A interpretação do valor da CCS pode ser difícil, visto que este parâmetro é influenciado por vários fatores – por exemplo, o número de lactações ou idade dos animais, fase da lactação, estação do ano, diferenças fisiológicas inatas do animal, intervalo entre ordenhas, momento de colheita das amostras de leite, transporte e armazenamento das mesmas, alimentação e stress –, porém a principal causa de variação neste parâmetro é a presença de infeção intramamária (Bradley e Green 2005; Lam et al. 2009; Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Assim, o valor proposto como limiar no leite para deteção de mamite é de 200 000 CS/ml, ao nível da vaca, e uma CCS superior a 100 000 CS/ml, ao nível do teto, poderá já ter impacto negativo na qualidade do leite (Bradley e Green 2005; Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017).

3.2.4.2. Teste de Condutividade Elétrica

Outro teste indireto para a detecção de inflamação no úbere é o teste da condutividade elétrica. Esta variável é determinada pela concentração de aniões (Cl^-) e catiões (Na^+ e K^+) no leite, medindo a resistência do leite a uma corrente elétrica. Existem dispositivos portáteis para determinação da condutividade elétrica, porém medições automáticas associadas a sistemas de máquinas de ordenha são mais fidedignas. O teste pode ser realizado ao nível de cada quarto mamário, permitindo uma avaliação através da comparação dos valores de todos eles. Possibilita a medição da lesão real do úbere, ao contrário da CCS que fornece informação sobre a resposta imunitária do animal aos danos causados, o que poderia permitir um diagnóstico precoce, porém a sua sensibilidade e especificidade não são suficientemente aceitáveis para testes de triagem de mamite por si só (Bradley e Green 2005; Constable et al. 2017).

Numa situação de mamite, as primeiras alterações no leite correspondem às alterações eletrolíticas (Constable et al. 2017), deste modo, existe uma diminuição na concentração de K^+ e aumento das concentrações de Na^+ e Cl^- (Pyörälä 2003), pois a permeabilidade capilar está elevada e existe destruição das zonas de oclusão celulares e das bombas de iões (Ruegg 2003), resultando, então, num aumento do valor da condutividade elétrica. No entanto, também este parâmetro apresenta limitações, sendo estas a sua variação com a temperatura do leite, a fase de lactação, o teor em gordura, o intervalo entre ordenhas e a raça do animal (Woolford et al. 1998; Pyörälä 2003; Ruegg 2003).

3.2.4.3. Cultura Bacteriológica

O tratamento e a prevenção de mamites são baseados no conhecimento da etiologia das mesmas, sendo, portanto, muito importante a recolha de amostras assépticas para cultura bacteriológica (Blowey e Edmondson 2010; Smith 2015) – um dos métodos mais comumente utilizados na identificação dos agentes causadores de mamites. Esta técnica é útil em casos de detecção de CCS elevadas com o auxílio do TCM, ou seja, mamites subclínicas, antes do tratamento de mamites clínicas (de forma a direcionar a terapêutica) e rotineiramente, aquando de compras de animais e em vacas recém-paridas, uma vez que fornece um diagnóstico precoce de possíveis IIM (Lévesque 2004).

Em laboratório podem ser submetidas tanto amostras de leite de tanque – permite uma noção geral dos microrganismos presentes na exploração –, amostras compostas dos vários quartos do úbere e/ou amostras de quartos individuais – fornecem informações mais relevantes (Smith 2015; Constable et al. 2017). No entanto, os resultados da cultura são extremamente dependentes da qualidade da amostra (Blowey e Edmondson 2010). Deste modo, a recolha deve ser feita após a desinfeção dos tetos, antes do processo de ordenha

propriamente dito e com recurso a luvas descartáveis, assim como a ponta do teto deve ser desinfetada, passando uma gaze com álcool a 70%, de forma a minimizar a possibilidade de contaminação bacteriana da amostra. O tubo para amostra deve estar estéril, e deve ser aberto sem tocar no seu interior; o leite é recolhido diretamente para o interior do tubo, após descartar os dois ou três primeiros jatos, e este é imediatamente fechado após a recolha. Três a cinco mililitros de leite são suficientes, devendo ser identificados e refrigerados a 4°C até à cultura, que pode ser feita até 24 horas após colheita (Blowey e Edmondson 2010; Smith 2015; Constable et al. 2017).

A metodologia usada na cultura bacteriológica consiste na inoculação destas amostras recolhidas em meios que contém os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Estes meios inoculados são colocados em estufas com atmosfera e temperatura apropriadas, para que o crescimento dos organismos alvo seja promovido. Após 24 a 48 horas, as placas cultivadas são examinadas e é recolhida uma amostra das bactérias que proliferaram nas mesmas. Após isolamento, através de testes específicos, dependentes das características das bactérias observadas, é possível a identificação do agente (Blowey e Edmondson 2010; Smith 2015).

Porém, as culturas bacteriológicas podem apresentar tanto resultados falsos positivos, como falsos negativos. Os casos falsos positivos devem-se, maioritariamente, a contaminações do leite por má higiene na colheita da amostra. Já os falsos negativos acontecem devido a mau acondicionamento das amostras, à presença de antibióticos ou leucócitos no leite que inibem o crescimento dos agentes patogénicos, à localização intracelular de algumas bactérias e a casos específicos de determinados agentes, como *Mycoplasma*, *E. coli* e *S. uberis*, que, respetivamente, requerem meios e condições ambientais especiais de cultura, podem já não se encontrar no leite aquando da colheita da amostra ou têm excreção intermitente (Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017). Também é possível o aparecimento de amostras consideradas contaminadas, uma vez que raramente três agentes coexistem numa só infeção e por isso foi convencionado que quando isolados mais de três microrganismos numa cultura esta seria considerada contaminada (Constable et al. 2017).

No caso do diagnóstico específico de *S. uberis*, a cultura bacteriológica é feita nos meios agar sangue, agar Edwards e/ou meio McConkey e incubada entre 30 e 37 °C, durante 24 a 48 horas. As colónias em meio agar sangue, geralmente, apresentam uma dimensão entre um e dois milímetros, são lisas, translúcidas e convexas. Em meio agar Edwards há crescimento de colónias castanhas, uma vez que há hidrólise da esculina em glucose e aesculetina (Blowey e Edmondson 2010; Kromker et al. 2014), e em agar sangue podem demonstrar uma fraca reação α ou γ -hemolítica (Kromker et al. 2014). Para identificação quanto à espécie, pode ser utilizada uma galeria API 20 Strep, um sistema

Vitek Gram-positivo e/ou testes bioquímicos (Jayarao et al. 1999; Rato et al. 2008). Segundo Odierno et al. (2006), o perfil bioquímico de *S. uberis* é baseado nos seguintes testes: crescimento negativo em meio com 6,5% NaCl e em incubação a 45°C; reação *Christie-Atkins-Munch-Peterson* (CAMP) negativa; hidrólise de arginina, esculina e hipurato de sódio positivas; crescimento positivo em meios contendo inulina; utilização de manitol, salicina e sorbitol como fonte de hidratos de carbono e ainda a incapacidade de utilização de rafinose para o mesmo fim (Kromker et al. 2014).

3.2.4.4. Testes Moleculares

Atualmente, os métodos moleculares permitem um conhecimento mais aprofundado da epidemiologia e fisiopatologia das IIM. O PCR é a técnica mais utilizada, já que possibilita a diferenciação de espécies e a caracterização genotípica das mesmas, sendo o diagnóstico mais esclarecedor (Kromker et al. 2014; Smith 2015). Baseia-se na amplificação e identificação de secções específicas de DNA bacteriano encontradas no leite que são, posteriormente, comparadas com sequências genéticas já documentadas (Lam et al. 2009; Smith 2015). Uma vez que o PCR é muito dispendioso, é mais utilizado em amostras de tanque de leite, permitindo uma noção dos agentes patogénicos presentes numa exploração leiteira.

Não é, porém, uma técnica suficiente para determinar a terapêutica a instaurar, visto que o DNA reconhecido tanto pode ser correspondente a bactérias vivas, como a mortas. Assim, de modo a aumentar a utilidade deste método de diagnóstico, as colheitas devem ser assepticamente recolhidas e o historial do animal e as respetivas CCS devem ser tidas em conta (Smith 2015).

3.2.5. Controlo

Para que se minimizem os prejuízos económicos, a transmissão de infeções pelo efetivo e as resistências a antibióticos, as explorações leiteiras devem implementar programas de controlo de mamites bovinas. No que toca ao *S. uberis*, um agente ambiental com carácter contagioso, estes programas devem focar-se não só no plano clássico de 5 pontos de Bramley e Dodd (1984), mas também ter cuidados com o ambiente dos animais (Kromker et al. 2014).

Em mamites por este agente, as medidas devem concentrar-se no período seco, período crítico de infeção, sendo a altura mais indicada para desenvolver estratégias que reduzam o seu impacto (Almeida et al. 2003). Além do tratamento de IIM já existentes, também o uso de selantes internos e de secagem seletiva, ou seja, recurso a antibióticos apenas em animais que apresentam condições que indiquem a sua necessidade, é uma boa forma de combate a este agente patogénico nesta fase (Kromker et al. 2014).

Fundamentalmente, para minimizar a exposição do teto ao *S. uberis*, é necessário um cuidado com o ambiente dos animais. Uma vez que as camas de palha são fatores predisponentes a esta infecção, seria mais adequado o uso de camas de matéria inorgânica, como é o caso da areia. Uma especial atenção nas camas do pré-parto é de extrema importância, podendo-se adicionar carbonato de cálcio ou superfosfato todos os dias, ou seja, alcalinizar as camas, pois, é possível controlar a multiplicação desta bactéria em ambientes com pH superior a 9,5 (Paduch et al. 2013; Kromker et al. 2014). Durante a lactação também são necessárias medidas, como a compostagem das camas de palha, realizada através da remoção do material de cama todos os dias. Na presença de cubículos pode, igualmente, ser adicionado carbonato de cálcio ou superfosfato, e manter o ambiente seco e limpo. Como referido, as pastagens são possíveis fontes de infecção, assim, devem ser evitados os aglomerados de vacas, cercando os pontos críticos, como sombras por debaixo das árvores. De uma forma geral, deve ser fornecida água limpa aos animais, visto que este agente também é encontrado frequentemente na água, possivelmente por contaminação das fezes (Kromker et al. 2014).

Sendo a ordenha uma das formas de transmissão de IIM por *S. uberis*, principalmente na colocação das tetinas, deve ser realizada uma higienização rigorosa dos tetos, antes do processo de ordenha (*pré-dipping*), com desinfetante de iodo, clorexidina ou dióxido de cloro (Kromker et al. 2014). Após a ordenha, uma desinfeção (*pós-dipping*) com os mesmos compostos poderá ter algum efeito bactericida, se for de longa persistência (Kromker et al. 2014). A diminuição do ar introduzido no teto aquando da colocação das tetinas poderá, também, diminuir o risco deste tipo de mamites. Já que o caráter contagioso deste agente permite uma transmissão de vaca para vaca, a desinfeção das tetinas após ordenha de cada vaca é um ponto crucial, assim como a separação das vacas com mamite para um lote de vacas doentes, para que mais facilmente se controle esta afeção.

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos inúmeros estudos com vista a desenvolver uma vacinação eficaz contra *S. uberis*, contudo a existência de várias estirpes não tem facilitado o processo. Desde o uso de um antigénio contra o ativador plasminogénico PauA (Blowey e Edmondson 2010), à utilização de antigénios baseados em SUAM recombinante (Almeida et al. 2015), várias metodologias continuam a ser estudadas. Atualmente, já está disponível uma vacina baseada na utilização de um antigénio contra o componente de adesão por formação de biofilme (BAC – *biofilm adhesion component*) – componente estrutural da parede de *S. uberis* –, fornecendo proteção contra as diferentes estirpes deste agente. Esta tem demonstrado reduzir os sinais clínicos em mamites agudas, promover uma recuperação mais rápida do animal, tanto a nível de CCS como na produção leiteira, e induzir níveis elevados de anticorpos específicos (Collado et al. 2018).

S. uberis é um agente comumente encontrado nas fezes e em matérias orgânicas, sendo o seu controlo uma tarefa de extrema importância, tanto no manuseio adequado das camas, como nos procedimentos higiénicos da ordenha. Visto que estas mamites se demonstram clínicas ou subclínicas com CCS muito elevadas e de cura difícil, continua a ser imperioso incidir na sua prevenção.

3.2.6. Terapêutica

Os protocolos terapêuticos de mamites, utilizados para auxiliar o sistema imunitário a eliminar o agente patogénico e a reduzir as consequências fisiopatológicas da infeção, devem ser estabelecidos pelo médico veterinário, baseando-se em vários aspetos, tais como, a eficácia estipulada, o impacto económico e o intervalo de segurança dos respetivos medicamentos (Smith 2015). Existem várias razões para instaurar uma terapia em caso de diagnóstico de mamites, e estas são a prevenção da transmissão da infeção para outras vacas, o restauro da produtividade do animal, a redução da probabilidade de casos recorrentes, evitar infeções prolongadas que provoquem lesões irreversíveis no úbere, diminuindo a qualidade do leite, e o aumento da saúde e bem-estar geral dos animais (Blowey e Edmondson 2010).

Para que exista uma redução do uso de antimicrobianos e um aumento da eficácia da terapêutica, deverão ser tidos em conta os seguintes métodos: utilização de culturas bacteriológicas, conhecimento da história da vaca, identificação dos fatores de risco a nível do animal e aplicação de protocolos terapêuticos padronizados a nível científico (Blowey e Edmondson 2010; Smith 2015; Constable et al. 2017). Estes planos passam pela separação do leite ou até da própria vaca mamítica, utilização de antimicrobianos e/ou tratamento de suporte – anti-inflamatórios, oxitocina, fluidoterapia, entre outros (Blowey e Edmondson 2010). A antibioterapia tem sido o método mais comumente utilizado, sendo escolhida cautelosamente com vista a promover eficácia terapêutica e benefícios económicos, tanto a nível da recuperação da produção leiteira, como na eliminação de fontes de infeção. Porém a sua eficácia está dependente de muitos fatores: propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, espetro de ação, duração da terapêutica e monitorização da mesma (Pyörälä 2009; Smith 2015; Constable et al. 2017). Portanto, na escolha de um antibiótico para tratamento de mamites, a sensibilidade do agente, a habilidade de penetração e persistência no úbere em concentração suficiente, a eficiência na presença de leite, a lipossolubilidade, a capacidade de ligação a proteínas plasmáticas, o intervalo de segurança e o custo são critérios que devem ser tidos em conta (Pyörälä 2009; Blowey e Edmondson 2010).

A instauração da terapêutica pode ser durante a lactação ou no período seco (Blowey e Edmondson 2010). Geralmente, em casos clínicos esta é aplicada durante a

lactação, já em situações subclínicas opta-se pelo período seco, para que se minimizem os impactos económicos (Pyörälä 2009; Kromker et al. 2014; Constable et al. 2017). Contudo, esta decisão deve sempre ter em conta várias condicionantes, como a existência de um programa de controlo de mamites na exploração; a raça e o valor genético do animal; os quartos infetados, o número de lactações e a fase de lactação das vacas; os agentes etiológicos envolvidos; o valor da CCS aquando do diagnóstico; e o protocolo terapêutico necessário (Constable et al. 2017). Durante a secagem – período crítico para a saúde do úbere – protocolos de terapia seletiva devem ser aplicados, não só para proceder à cura de IIM já presentes durante a lactação, como também para evitar novas infeções durante o período seco e utilização excessiva de antibiótico (Blowey e Edmondson 2010; Smith 2015).

A aplicação de terapêutica combinada, ou seja, terapia sistémica juntamente com intramamária, é comum em mamites por agentes de difícil eliminação, que têm como principal alvo o parênquima (Constable et al. 2017). A via intramamária dilige uma alta concentração de antibiótico no leite, contudo a introdução das bisnagas deve ser feita com bastante cuidado higiénico (Pyörälä 2009; Blowey e Edmondson 2010; Constable et al. 2017). A via sistémica evita bacteriémias e septicémias, levando potencialmente a uma rápida normalização da temperatura e da produção leiteira (Constable et al. 2017; Ruegg 2018) e maior penetração no parênquima mamário (Pyörälä 2009).

Devido à sua epidemiologia e a todos os fatores de virulência que dispõe, o êxito no tratamento das mamites por *S. uberis* tem-se mostrado cada vez mais difícil. Todavia, já que coloniza inicialmente os ductos e apenas posteriormente se instala no parênquima mamário, a via intramamária (IMM) é a escolha mais indicada (Milne et al. 2005; Kromker et al. 2014; Constable et al. 2017). Deste modo, o protocolo terapêutico passa por três administrações IMM a cada 12h, contudo, apesar de ser possível uma cura clínica, raramente é atingida a cura bacteriológica (Milne et al. 2005; Kromker et al. 2014; Constable et al. 2017). Para um aumento da cura bacteriológica, é recomendada uma terapia prolongada, cinco a oito dias, com administração IMM de ceftiofur, pirlimicina ou penetamato a cada 24h (Constable et al. 2017). Segundo Milne et al. (2005), também o uso de uma terapia pulsátil poderá ser eficaz, recorrendo a penicilina procaínica com dihidroestropomicina ou cefquinoma, via IMM, três vezes a cada 12h, em três “pulsos” com interrupção equivalente ao recomendado como intervalo de segurança para cada princípio ativo. O uso de anti-inflamatório no protocolo de tratamento está comprovado que diminui a CCS após tratamento e reduz também a taxa de refugo (Constable et al. 2017).

Na grande parte das estirpes de *S. uberis*, os planos de tratamento devem ser prolongados (Almeida et al. 2003; Pyörälä 2009; Kromker et al. 2014), sendo o mais indicado oito dias de terapêutica, uma vez que grande parte dos antibióticos utilizados por via IMM são tempo-dependentes. Deste modo, a ação inibitória destes tem maior eficiência

se a concentração do fármaco se mantiver acima da concentração mínima inibitória (CMI) por longos períodos de tempo no local da infecção (Smith 2015; Constable et al. 2017). Todavia, Samson et al. (2016) demonstrou que a probabilidade de cura aumenta quando do uso de terapêutica combinada juntamente com anti-inflamatório não-esteróide (AINE).

Em casos subclínicos de mamites por *S. uberis* no final da lactação, a terapia deve ser efetuada durante o período seco (Constable et al. 2017). Nesta fase, o tratamento resulta em taxas de cura mais elevadas e numa incidência de novas infecções na secagem e pós-parto mais reduzida (Williamson et al. 1995; Kromker et al. 2014). Ainda assim, muitas das vacas recidivam após tratamento, demonstrando que as recomendações indicadas até então não são suficientes.

3.2.6.1. Fatores Limitantes de Cura

Os fatores limitantes que levam a uma redução na eficácia da terapêutica podem ser a nível da vaca, incluindo a idade, a CCS antes do tratamento, a duração da infecção, fase de lactação e o número de quartos afetados (Steenefeld et al. 2007; Breen et al. 2011; Smith 2015), ou ao nível do agente patogénico.

Assim, animais com mais de duas lactações, história longa de inflamação antes do tratamento e múltiplos registos de CCS elevadas antes do diagnóstico têm muito menor probabilidade de cura, em caso de IIM (Samson et al. 2016).

Quanto ao *S. uberis*, a grande limitação na sua cura prende-se pelo facto deste poder ter presença intracelular (Blowey e Edmondson 2010). A capacidade de invasão das células epiteliais mamárias, a sua movimentação ao longo do epitélio (Constable et al. 2017), a presença em vasos linfáticos e linfonodos e ainda a formação de fibrose provocam uma grande redução no efeito da terapêutica (Samson et al. 2016). Também os restantes e inúmeros fatores de virulência já mencionados amplificam as limitações no processo de cura de IIM por *S. uberis*.

3.2.7. Resistência a Antibióticos

Atualmente, a existência de microrganismos resistentes a antibióticos é um problema global que resulta da utilização excessiva de antimicrobianos e que tem bastante impacto tanto no bem-estar animal, como na saúde humana, já que a ineficiência dos antibióticos resulta num aumento da morbidade e da mortalidade em algumas doenças infecciosas (Kapil 2005). Portanto, quando uma estirpe não é suscetível à concentração clinicamente proposta de um antimicrobiano e/ou possui mecanismos que impedem o antibiótico de atuar, considera-se que existe uma resistência (Cantón e Morosini 2011). Estas podem ser naturais ou adquiridas através de mutações cromossómicas, transferência de plasmídeos, de genes da própria bactéria e de genes de outras bactérias (Makovec e Ruegg 2003; Kapil 2005; Cantón e Morosini 2011).

Assim, qualquer terapêutica antimicrobiana deverá ser iniciada com base no perfil de sensibilidade do seu agente etiológico, recorrendo a testes de sensibilidade a antibióticos (TSA), ou seja, à determinação da sensibilidade dos agentes aos diferentes antimicrobianos (Makovec e Ruegg 2003). Vários métodos são utilizados para este efeito, alguns quantitativos – diluição em caldo, diluição em leite, inoculação em agar, determinação da concentração mínima bactericida (CMB) e determinação da cinética de morte –, e outros qualitativos, como o método de difusão em disco (Constable e Morin 2003). Este último, é o mais utilizado, tanto pela rapidez, como pelo baixo custo, e consiste na cultura da bactéria isolada e posterior colocação de discos impregnados com antibióticos específicos, procedendo-se à incubação das placas. Durante a incubação, existe dispersão do antibiótico que irá inibir o crescimento da bactéria nas redondezas do disco (Constable e Morin 2003; Erskine et al. 2003). O diâmetro dos halos obtidos está inversamente correlacionado à CMI dos agentes patogénicos – menor concentração de determinado fármaco que inibe o crescimento visível de um microrganismo após o tempo de incubação adequado (Constable e Morin 2003; Cantón e Morosini 2011) –, permitindo perceber se o microrganismo é suscetível ou resistente à terapia com um determinado antibiótico (Erskine et al. 2003).

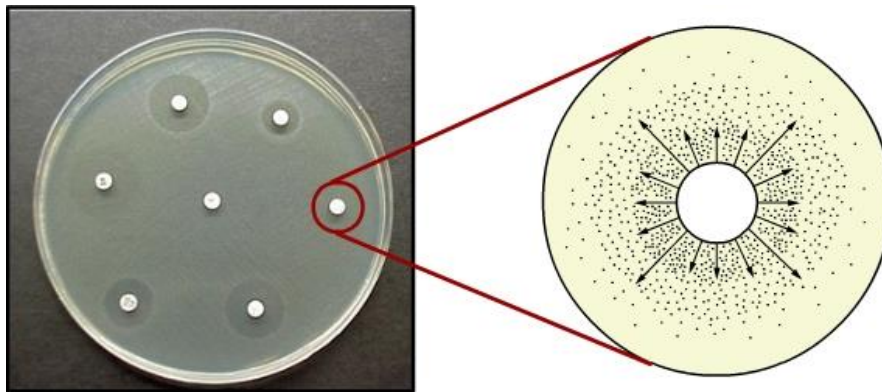


Figura 2 - Princípio do teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco (Fonte: Machado e Gales 2008)

Tem, porém, algumas limitações, começando pelo facto de ser um método qualitativo (resultados classificados em sensível, intermédio e resistente) e, portanto, estar dependente da análise do operador (Smith 2015; Constable et al. 2017). Os resultados obtidos com este teste muitas vezes não se correlacionam com os resultados clínicos, principalmente em vacas com mamites ambientais clínicas (Makovec e Ruegg 2003). A causa desta aparente incoerência poderá ser a utilização de dados como referência, maioritariamente, baseados em concentrações de antibiótico para outras afeções ou até mesmo espécies, assim como através de outras vias de administração, o que impede uma correlação fiável com as concentrações atingidas no leite ou no tecido mamário após administrações IMM ou sistémicas (Erskine et al. 2003; Smith 2015; Constable et al. 2017).

Na terapêutica de mamites por *S. uberis*, o conhecimento do perfil de sensibilidade do agente aos antimicrobianos é muito importante, já que fornece informação relevante para a escolha adequada do fármaco a utilizar. Segundo Pitkälä et al. (2008), este agente é sensível a penicilina, cefalotina e clindamicina, contudo apresenta algum nível de resistência a oxitetraciclina e eritromicina. Já McDougall et al. (2014), demonstrou que existe suscetibilidade a penicilina, ampicilina e amoxicilina com ácido clavulânico e que algumas estirpes poderão apresentar resistência a cloxacilina. Deste modo, com base no CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e no EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), *S. uberis* deveria ser declarado resistente a β -lactâmicos, por existir resistência a cloxacilina, porém existe pouca evidência de que este agente possua resistência a penicilina (McDougall et al. 2014). Thomas et al. (2015) comprova, também que não existe resistência aos β -lactâmicos, já que se confirma uma elevada suscetibilidade à sua generalidade, exceto a cloxacilina, que mais uma vez apresenta algum nível de resistência. Eritromicina e tetraciclina são outros antibióticos aos quais *S. uberis* apresenta elevados graus de resistência (Thomas et al. 2015).

Isolados do género *Streptococcus* apresentam resistência intrínseca a quinolonas, portanto num teste de difusão por disco têm tendência a obter um resultado equivalente a suscetibilidade intermédia (Boireau et al. 2018). É, então, compreensível que Boireau et al. (2018) tenha observado um elevado nível de resistência a enrofloxacina. Este autor verificou também baixos níveis de resistência a cloxacilina, gentamicina e trimetropim-sulfametoxazol, mas valores mais significativos quanto a tetraciclina, lincomicina e eritromicina.

Em suma, *S. uberis*, geralmente, apresenta suscetibilidade a grande parte dos antibióticos β -lactâmicos – penicilina, cefalotina, ampicilina e amoxicilina com ácido clavulânico – e a clindamicina. Tem sensibilidade intermédia a gentamicina e trimetropim-sulfametoxazol e as suas resistências incidem na cloxacilina (um β -lactâmico), em tetraciclina, na eritromicina, enrofloxacina e lincomicina (Pitkälä et al. 2008; McDougall et al. 2014; Thomas et al. 2015; Boireau et al. 2018).

3.3. Benzilpenicilina Procaínica

A benzilpenicilina procaínica deriva da penicilina G, um agente antibacteriano β -lactâmico da classe das penicilinas. Deste modo, *in vivo*, é hidrolisada e atua como um depósito que permite uma absorção lenta desta penicilina natural, podendo ser administrada tanto por via intramuscular (IM), como subcutânea (SC; Plumb 2011). Tem, assim, como espectro de ação várias bactérias Gram-positivas – *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. não produtores de penicilinase, *Bacillus anthracis*, *Arcanobacterium*, *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium* spp., *Fusobacterium* e

certas espécies de *Bacteroides* – e, ainda, algumas bactérias Gram-negativas – *Listeria monocytogenes* e *Pasteurella multocida* (Riviere e Papich 2018).

3.3.1. Farmacocinética

A absorção de penicilina G está dependente das distintas formulações existentes, das vias de administração e do local de injeção. A benzilpenicilina procaínica é considerada uma formulação de ação prolongada, logo a concentração plasmática deste princípio ativo é mantida por longos períodos, ou seja, tem uma absorção lenta que resulta num tempo de semi-vida superior. Em relação a outras formulações, apresenta uma concentração plasmática máxima baixa e leva algum tempo até atingir este ponto (Riviere e Papich 2018). No que diz respeito à distribuição, a benzilpenicilina procaínica difunde-se pelo fluido extracelular, podendo atingir concentrações intracelulares moderadas. É, então, metabolizado através da hidrólise do anel β -lactâmico, resultando em metabolitos microbiologicamente inativos. Já a eliminação é a nível renal, principalmente da secreção tubular, mas também da filtração glomerular, podendo este fármaco atingir elevadas concentrações na urina (Plumb 2011; Riviere e Papich 2018).

Aquando de administração intramamária, este princípio ativo é parcialmente reabsorvido pelo úbere, entrando apenas alguns iões de penicilina, por difusão passiva, no plasma. Portanto, a benzilpenicilina aplicada intracisternamente é distribuída parcialmente pelos restantes quartos do úbere, pela circulação linfática local e pelo plasma e uma porção fica irreversivelmente ligada ao leite e às proteínas tecidulares. Nestes casos, a sua eliminação ocorre pelo leite, na forma inalterada, através do quarto de úbere onde foi administrada, além da eliminação natural que ocorre pela urina (United States Pharmacopeia 2003). Em suma, pela via IMM, apresenta uma difusão moderada pelo tecido mamário (Divers e Peek 2008; Constable et al. 2017).

3.3.2. Farmacodinamia

A benzilpenicilina procaínica não é facilmente dissolvida em água e liberta benzilpenicilina e procaína – anestésico local – no organismo por meio de dissociação. É um princípio ativo tempo-dependente, já que a sua eficácia depende da quantidade de tempo que a concentração plasmática excede a CMI do agente patogénico (Taponen et al. 2003). Tem uma ação bactericida através da inibição da síntese de mucopéptidos constituintes da parede celular de bactérias proliferativas, por ligação a enzimas (carboxipeptidases, transpeptidases e endopeptidases) da membrana citoplasmática envolvidas na síntese da parede celular. Deste modo, as bactérias formam uma barreira defeituosa, alterando o seu equilíbrio osmótico, que impedirá a sua sobrevivência (Plumb 2011).

3.3.3. Aplicações em Mamites

Na terapêutica de mamites, a benzilpenicilina procaínica é indicada aquando de agentes etiológicos suscetíveis à mesma, como é o caso de *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e estafilococos coagulase negativos (Taponen et al. 2003; McDougall et al. 2007; Blowey e Edmondson 2010; Kalmus et al. 2014). No caso de mamites por estirpes de *Staphylococcus aureus* sensíveis a penicilina, o uso prolongado de benzilpenicilina procaínica está indicado por via intramamária, ao longo de quatro a oito dias (Constable et al. 2017). Para o tratamento de mamites por *S. uberis*, Kalmus et al. (2014) demonstrou que tanto a aplicação parenteral – injeção diária IM de 20 000 unidades/kg (20 mg/kg) de benzilpenicilina procaínica –, como a IMM – uma aplicação diária em cada quarto afetado com uma dose de 600 mg –, durante 5 dias, foram eficazes na obtenção não só de uma cura clínica, mas também bacteriológica.

Terapia exclusivamente intramamária apenas deve ser utilizada em casos com alterações inflamatórias moderadas no leite ou úbere. Mamites com alterações inflamatórias severas ou com sinais sistémicos requerem administração de antibióticos por via sistémica e/ou tratamento de suporte (United States Pharmacopeia 2003). Assim, a dose diária recomendada para utilização de benzilpenicilina procaínica via IM ou SC, em animais de produção, é de 66 000 unidades/kg de peso vivo (6.5 mg/kg) por uma duração inferior a sete dias consecutivos (Li et al. 2018; Riviere e Papich 2018). Quanto à via IMM, a dose recomendada é de 100 000 unidades (99 mg) em cada quarto mamário, a cada 12 horas, até um máximo de três aplicações (United States Pharmacopeia 2003; Li et al. 2018).

3.4. Ampicilina

A ampicilina é um princípio ativo com ação bactericida, pertencente à família das aminopenicilinas, diferindo da penicilina natural pelo facto de possuir um grupo amina. Deste modo, detêm um espetro de ação muito superior, uma vez que abrangem as bactérias suscetíveis a benzilpenicilina procaínica, acima referidas, e ainda algumas enterobacteriáceas, como certas estirpes de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* e *Salmonella* (Plumb 2011; Riviere e Papich 2018).

3.4.1. Farmacocinética

A administração de ampicilina pode ser por via SC ou IM, conduzindo a uma fase de absorção mais prolongada e, assim, uma duração de atividade superior. Apesar de todas as aminopenicilinas apresentarem um tempo de semi-vida curto, algumas formulações, como a anidra, permitem uma longa ação. Esta é distribuída por vários tecidos do corpo, como por

exemplo fígado, pulmões, músculo, fluido sinovial e pleural. Cerca de 20% do princípio ativo administrado estabelece ligação com proteínas plasmáticas, principalmente albumina, e no leite é encontrado em pequenas doses. A sua eliminação, um pouco mais longa que a da benzilpenicilina procaínica, processa-se a nível renal, maioritariamente por secreção tubular, porém, uma porção pode sofrer hidrólise para ácido penicilóico (metabolito inativo) e ser excretada, igualmente, através da urina (Plumb 2011; Riviere e Papich 2018). No que toca à difusão pelo úbere, ampicilina, administrada por via IMM, é considerada um princípio ativo eficiente (Constable et al. 2017).

3.4.2. Farmacodinamia

Como outras penicilinas, também a ampicilina é um agente bactericida tempo-dependente, agindo através da inibição da síntese da parede celular das bactérias suscetíveis (Plumb 2011). Em suma, existe penetração da parede e posterior ligação a proteínas específicas da membrana celular bacteriana, que, em bactérias em multiplicação ativa, conduzem a uma interferência na produção de peptidoglicanos da parede celular e, consequentemente, à lise dos microrganismos por alterações osmóticas (United States Pharmacopeia 2007).

3.4.3. Aplicações em Mamites

A ampicilina tem um espetro de ação que lhe permite atuar em mamites por várias etiologias. Tem sido demonstrado que proporciona uma terapêutica efetiva contra agentes Gram-negativos – sensibilidade de 40 a 80% in vitro (Divers e Peek 2008) –, coliformes – 35 a 68% de sensibilidade (Blowey e Edmondson 2010) –, estafilococos coagulase negativos, *Corynebacterium bovis* (Constable et al. 2017), *Streptococcus agalactiae* (Rossi et al. 2019) e *S. uberis* (Divers e Peek 2008). Esta pode, também, ser associada a cloxacilina, como tratamento inicial para mamites por *Staphylococcus aureus*, já que a produção de β -lactamases por este agente é bastante comum (Constable et al. 2017). Esta associação foi também utilizada com sucesso por Sérieys et al. (2005), que através de uma administração IMM diária (200 mg de cloxacilina com 75 mg de ampicilina) nos quartos afetados, durante 3 dias, obteve 71% de cura na terapêutica de mamites por *S. uberis*.

A dose recomendada, em animais de produção, é de 4.4 a 11 mg/kg, administrada por via IM, a cada 24 horas (Riviere e Papich 2018). Porém, em mamites por *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., devem ser utilizadas doses de ampicilina “extra-label”: 12-22 mg/kg, duas vezes por dia, sistemicamente (Divers e Peek 2008).

4. Objetivos

Uma vez que as mamites por *Streptococcus uberis* são um problema persistente, com consequências nefastas para o setor leiteiro e que acarretam uma grande dificuldade não só ao nível de tratamento, como também de controlo, esta dissertação visou ganhar maior conhecimento sobre este agente etiológico, bem como estudar a eficácia de uma abordagem terapêutica.

Com este intuito, pretendeu-se:

- Caracterizar algumas componentes da epidemiologia de *Streptococcus uberis* na região de estudo.
- Observar o perfil de sensibilidade a antibióticos nos casos estudados.
- Avaliar a eficácia duma terapêutica à base de benzilpenicilina procaínica intramamária, a vantagem de associar um antibiótico sistémico, neste caso a ampicilina, e qual a duração de administração com melhores resultados.
- Relacionar o período de lactação e o número de lactação do animal com a possibilidade de cura, assim como as CS presentes no leite aquando do diagnóstico.

5. Materiais e Métodos

5.1. Caracterização das Explorações

De forma a proceder a este estudo, foram recolhidas amostras de leite de vacas com sinais de mamite de várias explorações leiteiras assistidas pela Proleite – cooperativa de produtores de leite da zona centro litoral portuguesa.

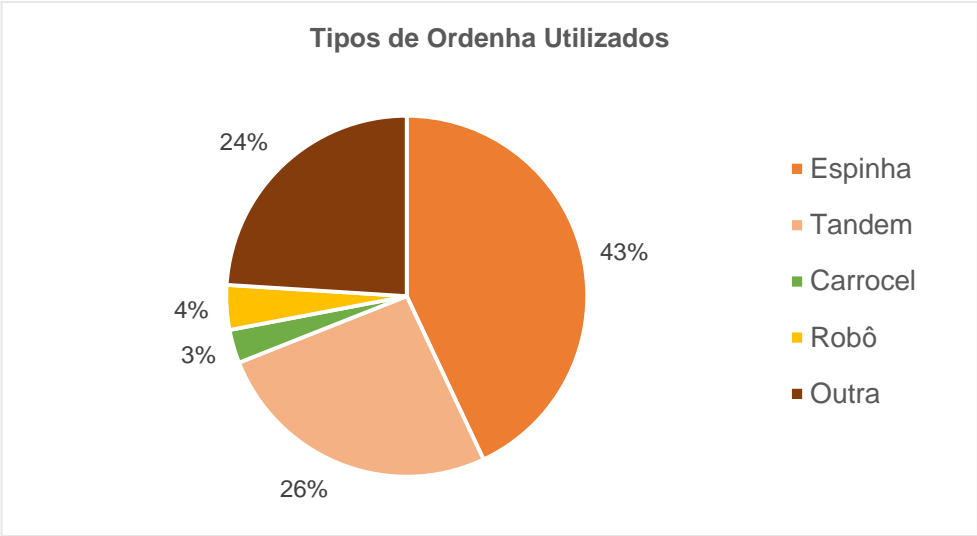
Neste conjunto foi possível encontrar um total de 174 explorações, que se apresentam muito diferentes entre si e com um número total de animais muito variável, desde 25 a 1000 animais em ordenha. Assim, existem desde explorações mais modernas e de grandes dimensões (Figura 3A) até pequenas explorações de caráter familiar (Figura 3B).



Figura 3 - Dois exemplos de explorações alvo do estudo. (A): Exploração de grandes dimensões. (B): Exploração de caráter familiar.

Deste modo, nas explorações assistidas pela Proleite existem diferentes sistemas de ordenha, com uma distribuição apresentada no gráfico 1, sendo os mais comuns a ordenha em espinha e tipo tandem. Também as rotinas de ordenha divergem bastante de exploração para exploração.

Gráfico 1 - Distribuição dos vários tipos de ordenha presentes nas explorações da Proleite.



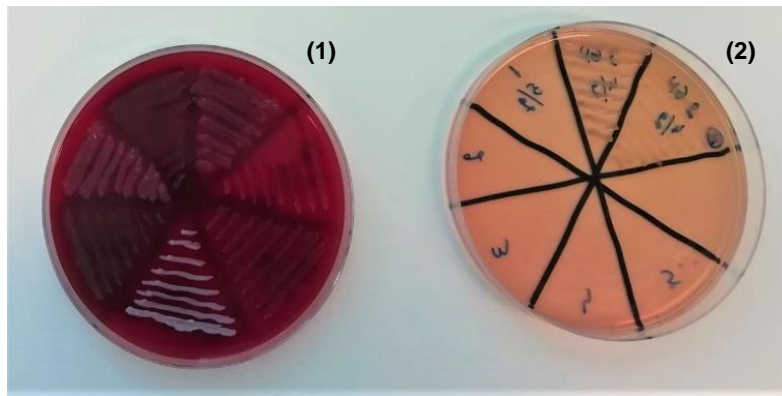
Quanto às vacas presentes nas explorações, é possível encontrar várias raças, apesar da maioria pertencer à raça *Holstein-Frísia*, existem também animais de outras raças como *Jersey*, *Montbeliard* e *Parda Suíça*.

5.2. Caracterização das Amostras

Durante um período de 5 meses, de 16 de setembro de 2019 até 18 de fevereiro de 2020, as análises de leite provenientes de vacas com sinais de mamite, tanto clínica, como subclínica, e identificadas com o agente *S. uberis* foram selecionadas, com vista a proceder ao estudo apresentado. As colheitas de leite foram efetuadas pelos próprios ordenhadores e

submetidas de do agente um TSA no Proleite.

Em identificação através de



a um processo identificação etiológico e a laboratório da

laboratório, a foi efetuada uma cultura

bacteriológica. Esta inclui uma sementeira em estria em placas de agar sangue e MacConkey (figura 4), submetida a uma incubação a 37°C durante 24-48 horas, para distinção entre bactérias Gram-negativas ou positivas. Visto que *S. uberis* é um agente Gram-positivo, a repicagem da colónia cultivada é efetuada para uma placa de agar sangue novamente e submetida a incubação a 37°C durante 24 horas, para o seu isolamento.

Figura 4 - Sementeiras em estria em placa de agar sangue (1) e MacConkey (2) após incubação.

De forma a proceder a identificação da bactéria isolada, e preparado um inoculo através da mistura de 3 ml de solução salina com o microrganismo isolado. Finalmente, este inóculo é inserido nas cartas do Vitek 2 Gram-positivo (figura 5), o sistema que procede à identificação do agente, emitindo um relatório com os resultados de todos os testes bioquímicos (anexo 2).



Figura 5 - Carta do Vitek Gram-positivo, após processo de identificação.

A fim de avaliar a suscetibilidade dos isolados de *S. uberis* aos antimicrobianos recorreu-se ao método de Kirby-Bauer, método de difusão por disco. Logo, utilizaram-se as colónias de *S. uberis* resultantes da repicagem, para elaborar uma suspensão com 0,5 na escala de McFarland de turvação em 1 ml de solução salina, procedendo, então, à sua cultura em placas de Müeller-Hinton Agar. De seguida, foram colocados na placa discos impregnados com os seguintes antibióticos: amoxicilina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefquinoma (30 µg), cefoperazona (75 µg), cloxacilina (5 µg), penetamato (100 µg), tilosina (30 µg), marbofloxacina (5 µg), penicilina (10 unidades), cefalexina (15 µg), danofloxacina (5 µg), enrofloxacina (5 µg) e trimetropim-sulfametoxazol (1,25-23,7 µg). Após uma incubação a 37°C durante 24 horas, os resultados (figura 6) são interpretados de acordo com os critérios definidos pelo documento VET08 do CLSI (2018).

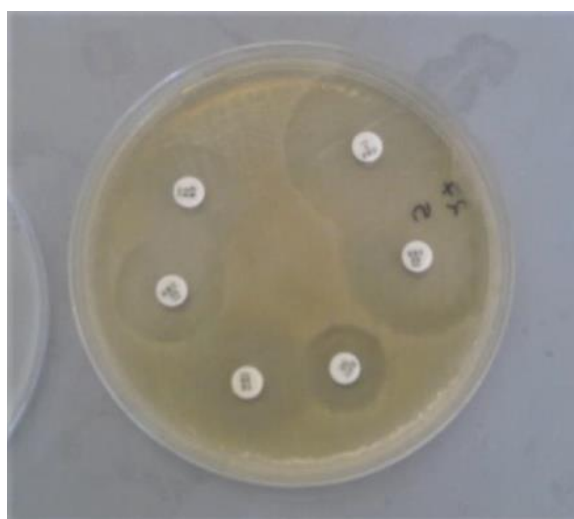


Figura 6 - Placa de Müeller-Hinton Agar resultante de um TSA pelo método de Kirby-Bauer.

Assim, os casos de mamites identificados com *S.* foram submetidos às várias abordagens terapêuticas em estudo. Através dos resultados disponíveis no contraste

leiteiro, foram ainda registadas algumas características de cada animal e da respetiva infeção, como dias em leite, número de lactação, número de quartos mamários afetados e CCS (figura 7). O registo das CCS foi efetuado com vista a recolher informação sobre os quatro meses anteriores à infeção, o momento do diagnóstico e decorridos os 14 dias após o tratamento, consoante o contraste leiteiro disponibilizado.

RESULTADOS DO CONTRASTE LEITEIRO

Exploração: **eabi** Data do Contrato: 2020-03-02 Contratador: 399137
 Proprietário: Tipo de Contrato: A4 (2) Data de Processamento: 2020-03-04 12:17
 Data de Impressão: 2020-03-04 12:39

Identificação	Data	Idade ao Parto	Lact. n.	Produção no Contraste			C.C.S. (x1000)	Ureia (mg/kg)	Dias	Produção Acumulada			Índice Lact.	Produção aos 105 dias			Data Ocorrência
				Leite (kg)	TB (%)	TP (%)				Leite (kg)	TB (%)	TP (%)		Leite (kg)	TB (%)	TP (%)	
00001	2019-06-30	03-09	2	24,4	4,16	3,84	704	317	248	6771	4,15	3,40	91	8281	4,15	3,48	
00002	2019-06-19	01-08	1	15,6	4,04	3,72	73	305	169	3028	4,53	4,02	87	5332	4,55	4,06	
00003	2019-03-14	03-04	2	23,2	5,15	2,97	97	248	354	12299	4,61	3,39	106	10952	4,63	3,34	
00005	2019-07-04	03-04	2	18,9	3,88	3,76	225	241	242	4473	4,01	3,63	94	5427	3,96	3,66	
00007	2019-07-29	01-10	1	20,1	6,03	3,56	47	273	217	5147	4,14	3,48	94	7195	4,31	3,50	
00008	2019-06-19	03-07	2	20,7	3,89	3,65	13	274	47	1568	2,99	3,73	95	8361	3,49	3,65	
00009	2019-06-19	03-02	2	27,6	6,43	4,13	66	331	197	5733	4,97	3,82	100	8373	4,88	3,87	
00011	2020-01-14	03-04	2	29,2	2,91	3,24	10	249	48	2136	4,13	3,32	107	10715	3,60	3,35	
00012	2019-06-21	02-09	2	28,5	3,45	3,73	300	295	194	6176	3,99	3,48	97	9081	3,89	3,52	
00013	2020-01-14	03-01	2	22,4	3,69	3,58	49	327	48	1615	3,47	3,56	92	8383	3,76	3,67	
00015	2020-02-26	03-01	2	21,4	3,24	3,45	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	
00017	2019-06-15	02-04	1	18,3	6,58	4,61	86	287	261	5081	5,96	4,10	87	5794	6,18	4,21	
00018	2019-03-30	02-00	1	16,9	6,04	5,42	190	259	338	6166	5,32	4,46	83	5609	5,27	4,45	
00019	2019-06-20	02-03	1	21,4	4,41	3,93	64	259	158	4269	4,39	3,64	95	7993	4,34	3,65	
00020	2019-07-31	01-10	1	21,2	4,63	3,93	186	217	215	5340	4,34	3,67	95	7426	4,32	3,71	
00022	2019-07-13	02-01	1	26,1	2,97	3,35	20	281	171	5206	3,14	3,10	103	8852	3,26	3,20	
00023	2019-08-13	02-00	1	20,6	3,98	3,21	233	252	171	4202	4,35	3,66	95	7148	4,27	3,66	
00062	2019-06-14	08-00	5	23,7	3,49	3,62	231	277	535	17841	3,72	3,27	109	11029	3,80	3,09	
00090	2019-06-24	07-02	6	27,6	3,69	3,61	338	258	159	4863	3,61	3,44	94	7846	3,83	3,56	
00097	2019-06-12	06-11	5	22,1	4,21	3,51	-	-	203	5329	4,84	3,24	97	7580	4,61	3,20	2020-03-02 Venúcia
00075	2020-01-15	07-04	6	29,3	3,89	3,69	1340	254	47	1770	4,17	3,03	99	9238	3,83	3,23	
00740	2019-09-21	08-02	7	27,7	2,93	3,61	1516	293	163	5763	3,47	3,22	95	8847	3,58	3,34	
00788	2019-12-11	05-04	4	3,8	4,89	3,85	189	274	447	13685	3,67	3,36	112	11535	3,26	3,06	
00789	2019-07-23	08-00	5	29,3	4,07	3,61	80	312	223	7203	3,84	3,26	94	9419	3,95	3,33	
00098	2019-06-22	08-01	5	29,2	3,72	3,54	12	289	159	6161	4,54	3,29	108	10423	4,56	3,45	

Figura 7 - Exemplo de um relatório do resumo mensal do CL de uma exploração em estudo (retirado de Bovinfor®).

5.3. Protocolo Terapêutico

Após a identificação de *S. uberis* nas amostras de leite de vacas com sinais de mamite, estas foram sujeitas a um dos três protocolos terapêuticos em estudo alternadamente, ou seja, primeiramente um caso foi atribuído ao grupo A, o seguinte ao grupo B e o posterior ao grupo C e assim sucessivamente. O grupo A (n=11) foi submetido a uma administração intramamária diária, durante sete dias, de 3 g de benzilpenicilina procaínica monohidratada (Procopen Injector; Prodivet ZN). O grupo B (n=4) seguiu uma terapia semelhante, porém com uma duração inferior, cinco dias. Já o grupo C (n=7) foi sujeito à terapêutica do grupo B, com a adição de três injeções de 40 ml, por via IM, a cada 48 horas, de 100 mg/ml de ampicilina (Albipen LA; MSD).

A verificação da eficácia de cada protocolo foi obtida através do registo das CS presentes no leite de cada vaca, após a conclusão da respetiva terapêutica, num período igual ou superior a 14 dias, dependente do contraste leiteiro disponibilizado. Desta forma, foi possível perceber se a cura clínica de infeção por *S. uberis* foi atingida.

5.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do programa Excel do Microsoft Office 365®, que após construção de uma base de dados com a informação recolhida, permitiu o cálculo de frequências relativas e absolutas, medianas, máximos e mínimos, entre outros. Associações estatísticas, como o teste exato de Fisher, foram testadas através do IBM SPSS Statistics®.

Quando apropriado, variáveis contínuas foram convertidas em variáveis categóricas. Assim, os dias em leite foram divididos pelos vários períodos de lactação, ou seja, início da lactação – até 75 dias em leite (DEL) –, lactação média – entre 76 e 225 dias em leite – e final da lactação – acima de 225 dias em leite. Também, o número de lactações foi distribuído por duas categorias com vista a refletir a paridade do animal: primíparas, quando o animal apresentava apenas uma lactação, e múltíparas, quando o número de lactações era igual ou superior a dois.

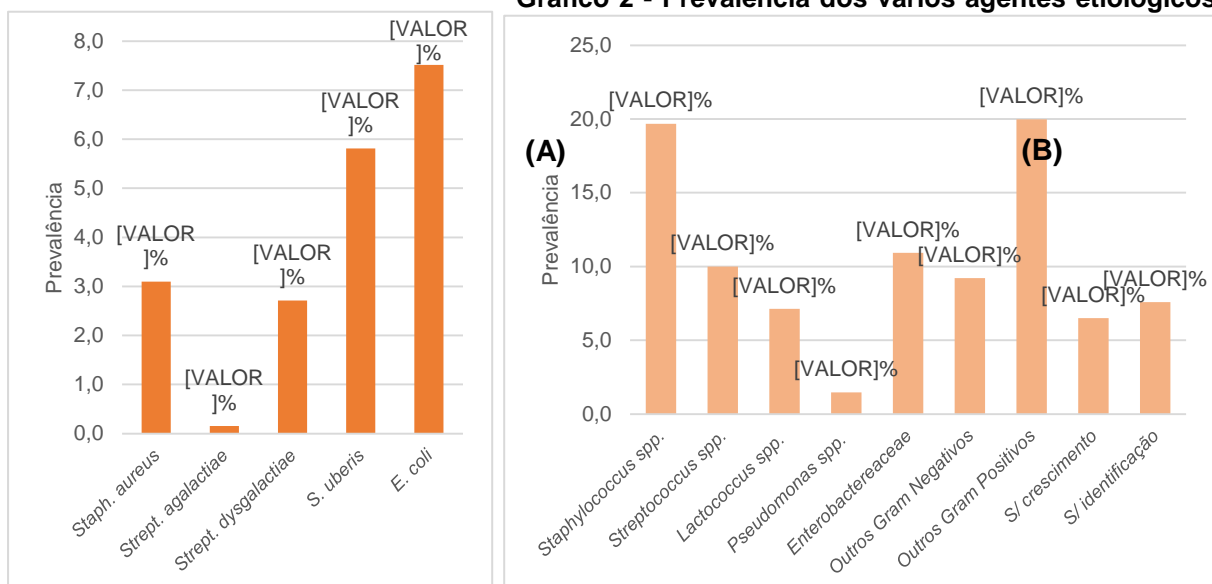
A cura clínica foi considerada atingida quando, no contraste disponibilizado decorridos 14 dias após o término do tratamento, a CCS do leite da vaca em causa se encontrava inferior a 200 000 CS/ml, já a falha terapêutica corresponde a CCS superiores a 200 000 CS/ml.

6. Resultados

6.1. Epidemiologia

Na tentativa de proceder a uma caracterização epidemiológica de *S. uberis* nas explorações assistidas pela Proleite, foi calculada a proporção de infeções causadas por este agente, num total de 1291 amostras de leite avaliadas, relativas a vacas com sinais clínicos de mamite ou com indicação de CCS elevadas, no ano de 2019. Deste modo, obteve-se um resultado de 5,8% de mamites por *S. uberis* (gráfico 2A), sendo igualmente observado que 10% dos isolados pertenciam ao género *Streptococcus*, 19,7% ao género *Staphylococcus* e 7,1% ao género *Lactococcus* (gráfico 2B). As amostras dadas como contaminadas foram excluídas da análise.

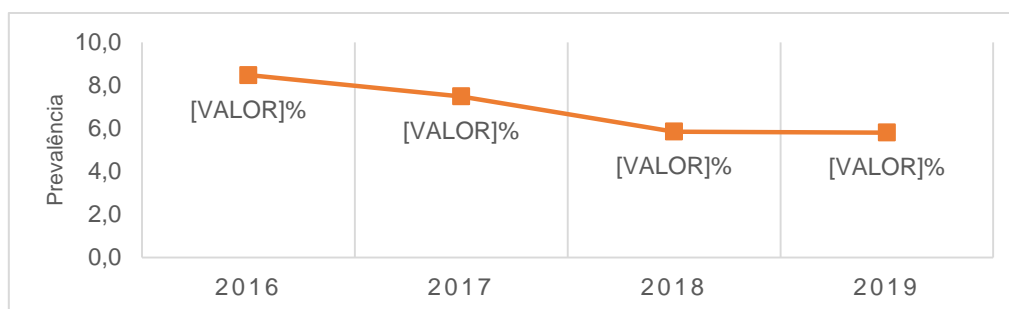
Gráfico 2 - Prevalência dos vários agentes etiológicos



identificados em amostras de leite, relativas a vacas, assistidas pela Proleite, com sinais de mamite no ano de 2019. (A): Proporção dos agentes mais isolados. (B): Proporção dos vários grupos de agentes etiológicos identificados.

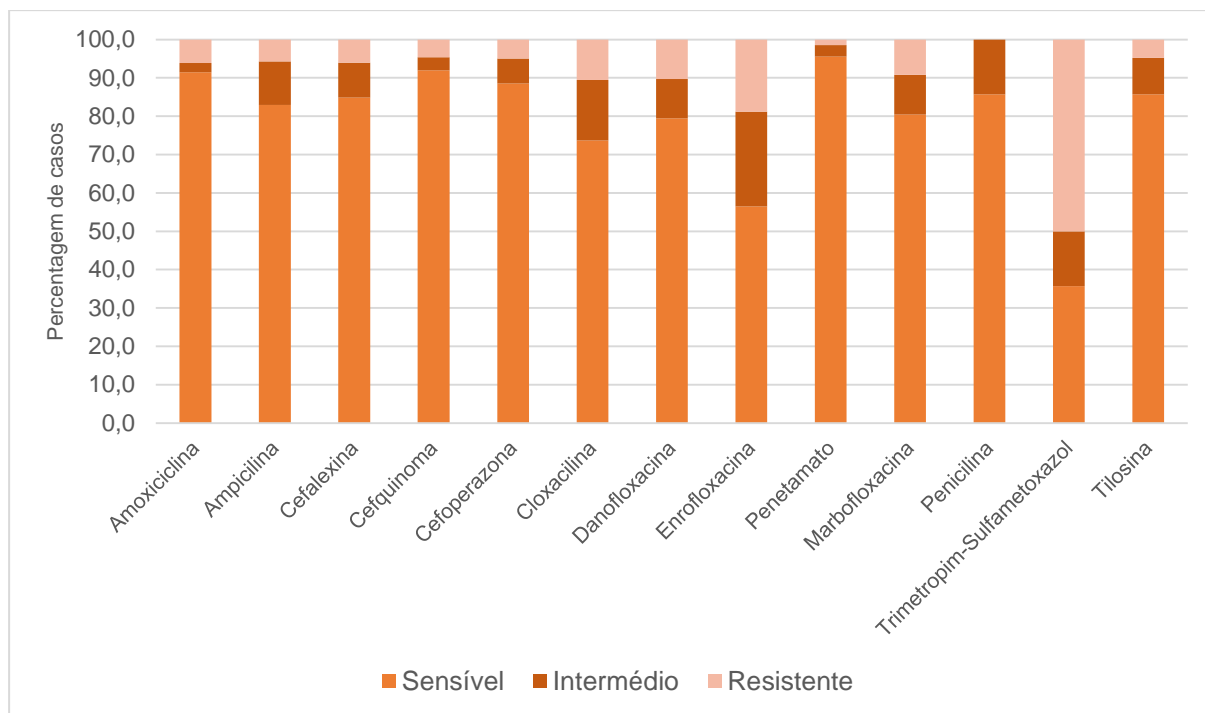
Este registo foi também efetuado durante vários anos, desde 2016, permitindo afirmar que ao longo do tempo a prevalência de *S. uberis* tem vindo a diminuir (gráfico 3), uma vez que os valores obtidos são de 8,5% no ano de 2016, 7,5% em 2017 e 5,9 e 5,8% nos anos de 2018 e 2019, respetivamente.

Gráfico 3 - Prevalência de mamites por *S. uberis* ao longo do tempo, diagnosticadas em explorações assistidas pela Proleite.



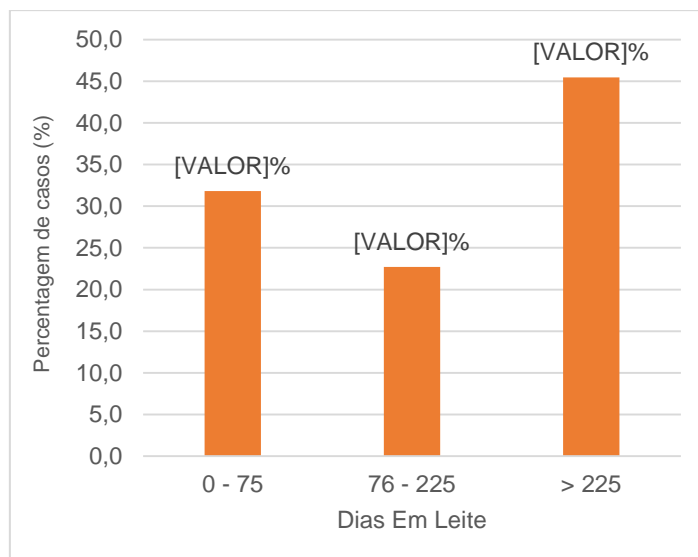
A todas as 75 amostras identificadas com *S. uberis*, foi realizado um teste de sensibilidade a antimicrobianos. Dos isolados em estudo, podemos destacar que 10,5% apresentaram resistência a cloxacilina, 10,3% a danofloxacina, 18,8% a enrofloxacina, 9,2% a marbofloxacina e 50% a trimetropim-sulfametoxazol. Quanto a suscetibilidades, 91,5% foram totalmente sensíveis a amoxicilina, 92% a cefquinoma, 95,6% a penetamato e 85,7% a penicilina (gráfico 4). Portanto, pode-se afirmar que trimetropim-sulfametoxazol foi o antimicrobiano ao qual foram detetados mais isolados com resistência e penicilina o antimicrobiano sem qualquer identificação de resistências. Por ordem decrescente de sensibilidade, os antimicrobianos em estudo apresentam-se da seguinte forma: penetamato, cefquinoma, amoxicilina, cefoperazona, penicilina e tilosina, cefalexina, ampicilina, marbofloxacina, danofloxacina, cloxacilina, enrofloxacina e trimetropim-sulfametoxazol. Em praticamente todos os casos identificados com *S. uberis* a percentagem de isolados sensíveis foi superior às resistências encontradas. Porém, no caso de trimetropim-sulfametoxazol o padrão inverteu-se, apresentando este uma maior percentagem de isolados resistentes do que sensíveis.

Gráfico 4 - Padrão de suscetibilidades dos isolados de *S. uberis* identificados em 2019, nas explorações assistidas pela Proleite.



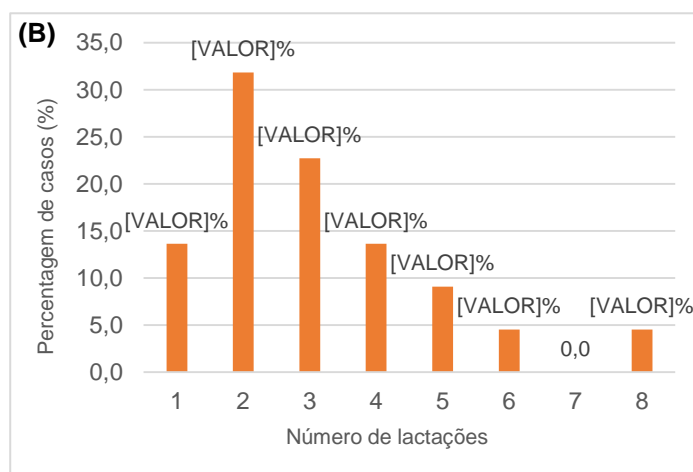
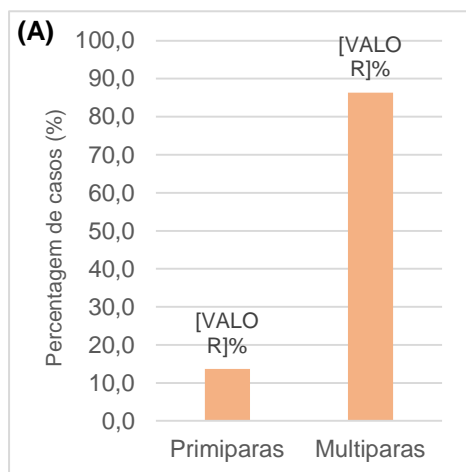
Para o presente ensaio, foi possível estudar um total de 22 animais diagnosticados com IIM por *S. uberis*, provenientes de 15 explorações diferentes, sendo que uma das explorações apresentou cinco casos, três apresentaram dois casos e as restantes 11 demonstraram a existência de apenas um caso por exploração. Deste modo, nestes animais foram analisados o período de lactação e a fase produtiva em que estas infecções aconteceram. No que concerne à fase de lactação, foi possível constatar que 45,5% das vacas manifestaram mamite após 225 dias em leite, 31,8% nos primeiros 75 dias de lactação e 22,7% entre os 75 e 225 dias em leite. Assim, pode-se afirmar que estas mamites são mais frequentemente identificadas na última fase de lactação (gráfico 5).

Gráfico 5 - Distribuição dos animais com infecção por *S. uberis* por cada fase de lactação.



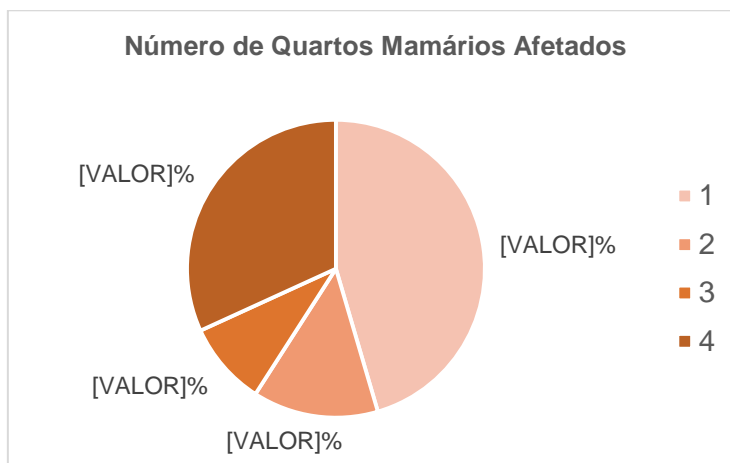
A média de lactações, nestes casos, foi de 3,1 (DP = 1,7) e, em termos percentuais, 86,4% das vacas identificadas com infecção eram múltiparas (gráfico 6A), já que 31,8% das vacas apresentaram mamite por *S. uberis* na segunda lactação, 22,7% na terceira, 13,6% na quarta, 9,1% na quinta e 4,5% tanto na sexta, como na oitava lactação (gráfico 6B). Os restantes 13,6% correspondem a animais no início da fase produtiva, ou seja, apenas com uma lactação.

Gráfico 6 - (A) Distribuição de vacas primíparas e múltiparas identificadas com infecção por *S. uberis*. (B) Distribuição de animais com infecção por *S. uberis* por cada fase produtiva.



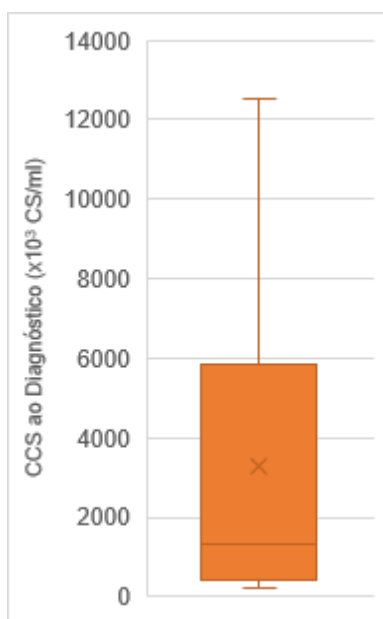
No que toca ao número de quartos mamários afetados, a maioria, 45,5% das infecções, ocorre apenas num só quarto do úbere, seguindo-se a apresentação de infecção nos quatro quartos mamários, em 31,8% dos casos. A presença de mamite em dois quartos mamários e três, foi encontrada, respetivamente, em 13,6% e 9,1% dos casos (gráfico 7).

Gráfico 7 - Distribuição dos casos estudados por número de quartos mamários afetados.



Aquando do diagnóstico de cada caso estudado, foram registadas as CCS da amostra composta de leite de cada animal com mamite por *S. uberis*, permitindo, então, afirmar que o valor mínimo encontrado foi 237 000 CS/ml e o valor máximo 12 513 000 CS/ml. É, também, possível constatar que a mediana e a média foram 1 339 500 CS/ml e 3 276 000 CS/ml, respetivamente, e que 50% dos valores se encontravam entre 413 000 e 5 822 500 CS/ml (gráfico 8). Porém, este diagrama de extremos e quartis demonstra uma assimetria positiva, denotando, então, que valores de CCS superiores à mediana se apresentam mais dispersos.

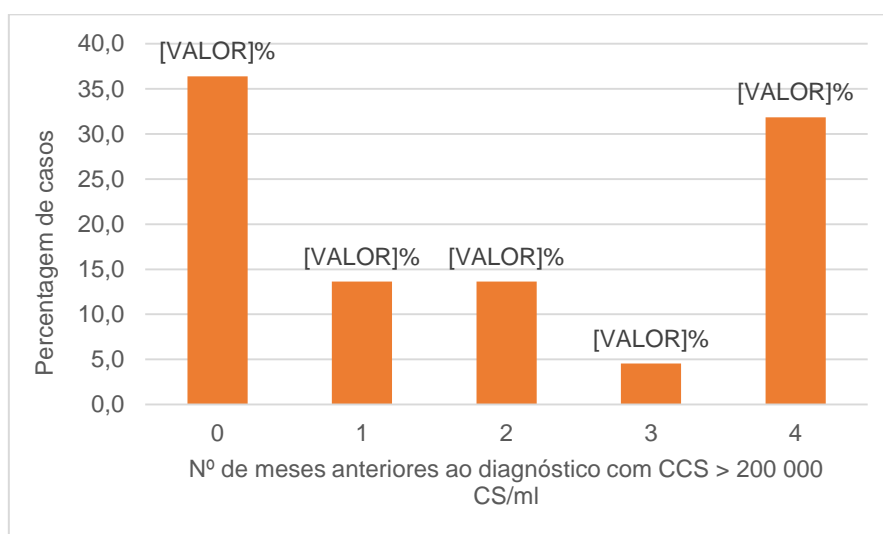
Gráfico 8 - Análise das CCS aquando do diagnóstico de mamite por *S. uberis*.



Assumindo que todos os meses anteriores ao diagnóstico de mamite por *S. uberis* com CCS superiores a 200 000 CS/ml se deviam a este mesmo agente, foi possível analisar

a duração desta IIM. Assim, correspondendo zero à presença de valores superiores a 200 000 CS/ml apenas ao diagnóstico, observou-se que 31,8% das infeções durariam já há quatro meses, 4,5% há três meses, 13,6% tanto há um como há dois meses e 36,4% apenas se iniciaram aquando do diagnóstico (gráfico 9). Foi então possível afirmar que a maioria dos casos diagnosticados corresponde a infeções com uma duração prolongada (63,5%).

Gráfico 9 - Distribuição dos casos diagnosticados com *S. uberis* consoante a duração de infeção (zero corresponde à presença de valores superiores a 200 000 CS/ml apenas ao diagnóstico).



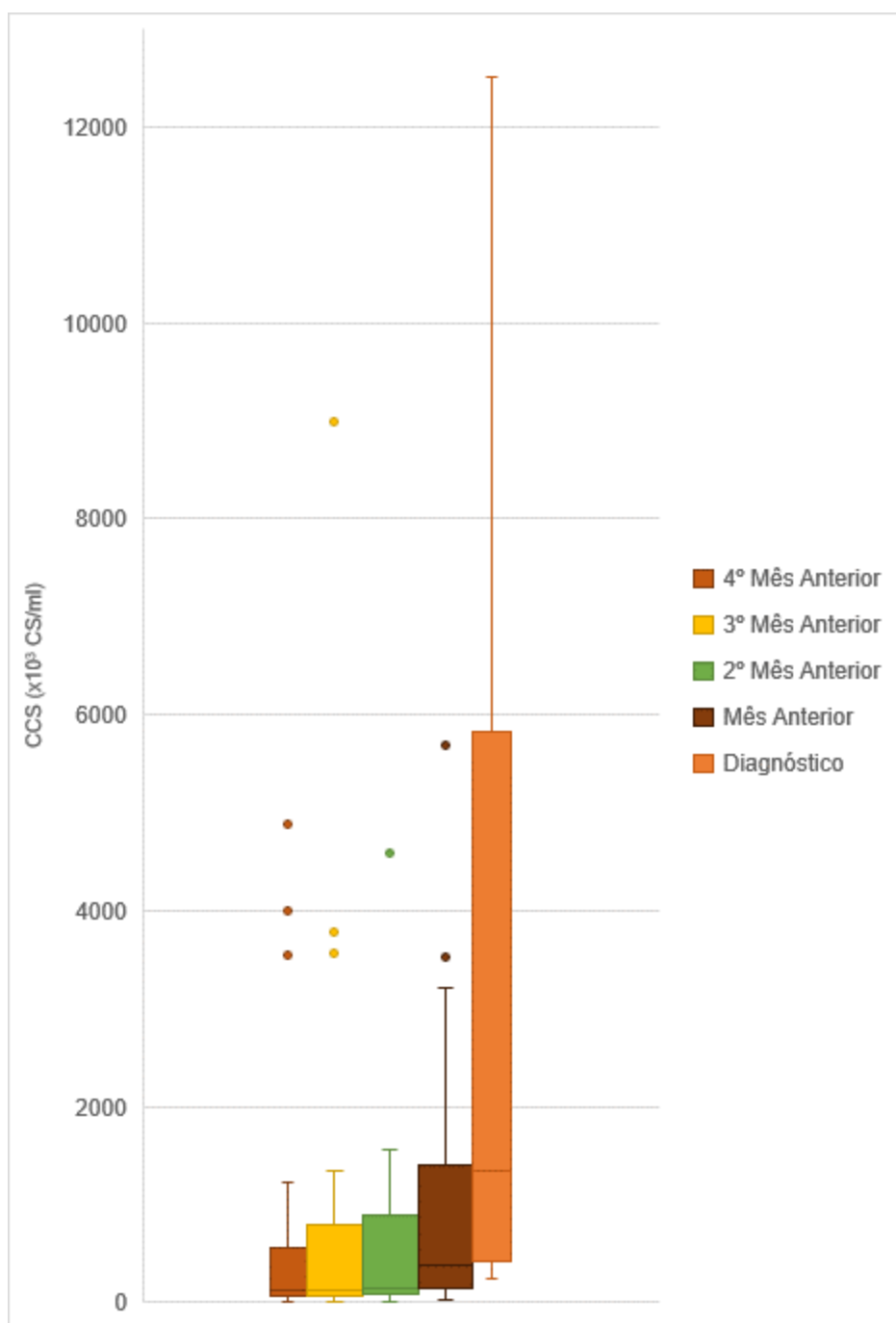
Nesta perspetiva de analisar o historial destes animais com infeção, foram analisadas as informações sobre as CCS nos meses anteriores ao seu diagnóstico. Portanto, foi possível aferir que as CCS, tanto na mediana, como na dispersão dos dados e nos valores máximos, sofreram aumentos mínimos ao longo do quarto, terceiro e segundo meses anteriores ao episódio clínico, porém no mês imediatamente anterior o aumento terá sido mais significativo, e aquando do diagnóstico verificou-se um incremento abrupto. Assim, foram obtidas as seguintes medianas, no decorrer do tempo: no quarto mês anterior à infeção, 121 500 CS/ml; no terceiro mês anterior, 132 500 CS/ml; no segundo mês anterior, 139 500 CS/ml; no mês anterior, 388 000 CS/ml; e aquando do diagnóstico, 1 339 500 CS/ml (tabela 2). É, também, de notar que existem vários *outliers* nos meses anteriores à deteção de infeção, e ainda, que todos os meses apresentam uma assimetria positiva, assim como os valores ao diagnóstico, indicando que os valores superiores à mediana se encontram com uma dispersão mais acentuada (gráfico 10).

Tabela 2 - Valores das CCS encontrados nos meses anteriores ao diagnóstico de mamite por *S. uberis*.

CCS (x 10 ³ CS/ml)

Meses anteriores à infecção	Mediana	50% dos valores	Mínimo	Máximo
1	388	139,75 – 1 410	22	3 219
2	139,5	139,5 – 1 410	16	1 566
3	132,5	61,5 – 797,75	8	1 342
4	121,5	67,5 - 561	16	1 226

Gráfico 10 - Comparação dos valores das CCS no leite nos meses anteriores ao diagnóstico de mamite por *S. uberis*.

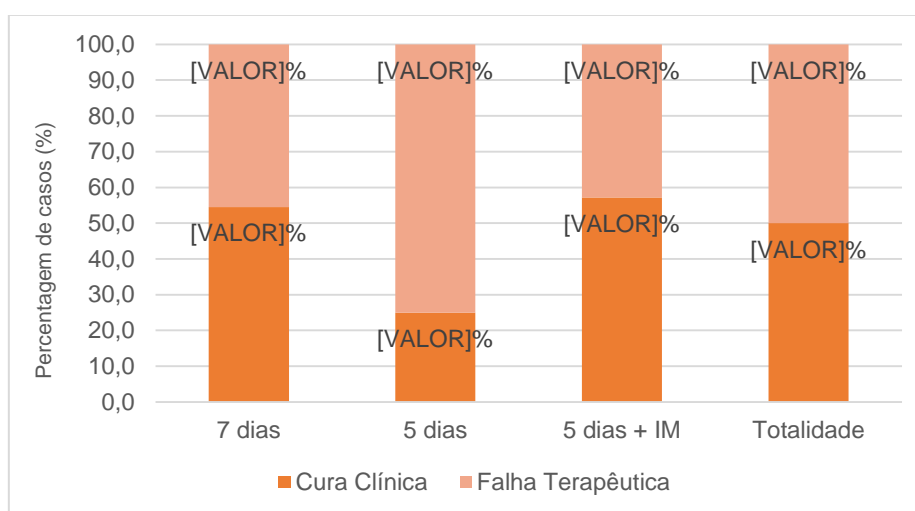


6.2. Terapêutica

No que diz respeito ao estudo de eficácia das terapêuticas aplicadas, foram calculadas as frequências absolutas e relativas (FA e FR) tanto da cura clínica, como da

falha terapêutica, ou seja, das vacas que apresentavam CCS inferiores ou superiores a 200 000 CS/ml, no contraste disponibilizado decorridos 14 dias após o término do tratamento. Assim, foi possível verificar que, nas terapias à base de benzilpenicilina procaínica intramamária, de duração de sete dias, cinco dias e cinco dias juntamente com administração intramuscular de ampicilina, as percentagens de cura clínica foram, respetivamente, 54,5%, 25% e 57,1% (gráfico 11). Na totalidade, das 22 vacas com infeção por *S. uberis* submetidas a tratamento, 50% (n=11) apresentaram uma cura clínica, e as restantes 50% (n=11) acabaram por demonstrar uma falha terapêutica.

Gráfico 11 - Frequências relativas de cura clínica nos vários protocolos terapêuticos em estudo.



Através de um teste exato de Fisher, verificou-se que não existe evidência estatística para afirmar que há uma associação entre a cura clínica obtida e o protocolo terapêutico utilizado, uma vez que, dado um valor de $\alpha = 0,05$, a hipótese nula não pode ser rejeitada, pois o valor obtido (1,236) resulta em $p > 0,05$ ($p = 0,725$), segundo demonstra a tabela 3 e o anexo 3.

Tabela 3 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com os diferentes protocolos terapêuticos utilizados.

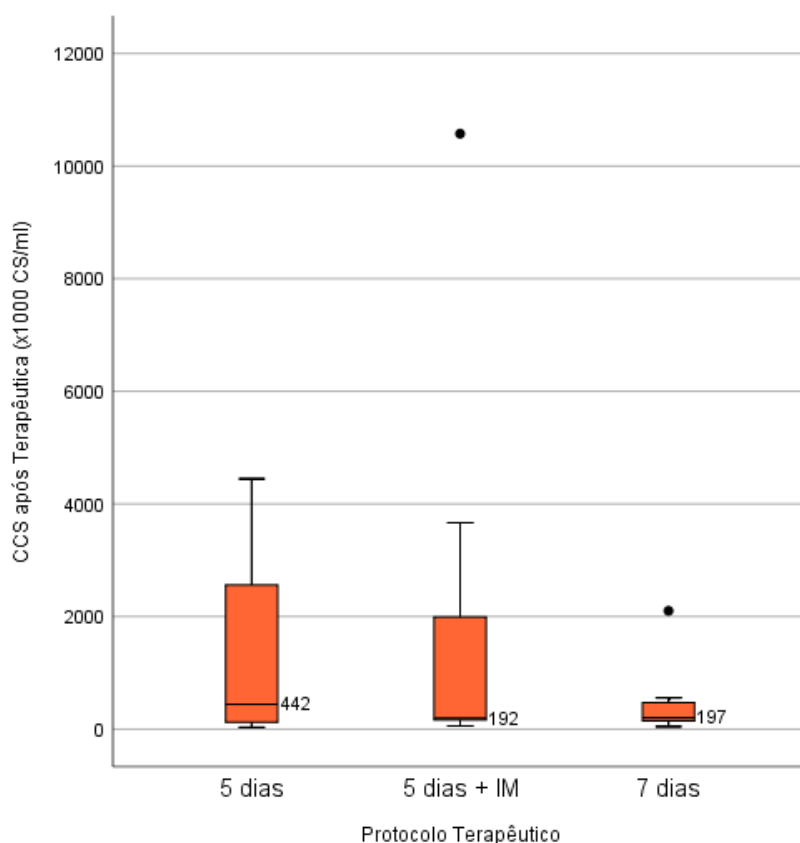
	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,234 ^a	2	,540	,725
Razão de verossimilhança	1,281	2	,527	,725
Teste Exato de Fisher	1,236	----	-----	,725
N de Casos Válidos	22	----	-----	-----

a. 4 células (66,7%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,00.

As CCS do leite dos animais após cada terapêutica, registadas através do contraste disponibilizado decorridos os 14 dias após o término do tratamento, demonstram uma dispersão semelhante nos tratamentos com duração de cinco dias, tanto IMM como com

associação de ampicilina IM, já na terapia de sete dias a dispersão foi muito inferior. As medianas obtidas no tratamento de sete dias e na terapia de cinco dias juntamente com administração IM foram, também, muito próximas. Assim, no tratamento com duração de sete dias, as CCS apresentam um valor mínimo de 44 000 CS/ml e um máximo de 557 000 CS/ml. Já a mediana encontrada é 197 000 CS/ml e a média 438 272 CS/ml. Na terapêutica IMM de cinco dias juntamente com administração IM é possível constatar um mínimo de 56 000 CS/ml, um máximo de 3 663 000 CS/ml, uma mediana de 192 000 CS/ml e uma média de 2 161 570 CS/ml. Finalmente, na terapia apenas IMM com duração de cinco dias encontram-se valores de CCS com uma média de 1 340 500 CS/ml, uma mediana de 442 000 CS/ml, um mínimo de 32 000 CS/ml e ainda um máximo de 4 446 000 CS/ml. Em todos os protocolos terapêuticos é possível afirmar que existe uma assimetria positiva, indicando que os valores com mais dispersão se apresentam acima do valor da mediana (gráfico 12).

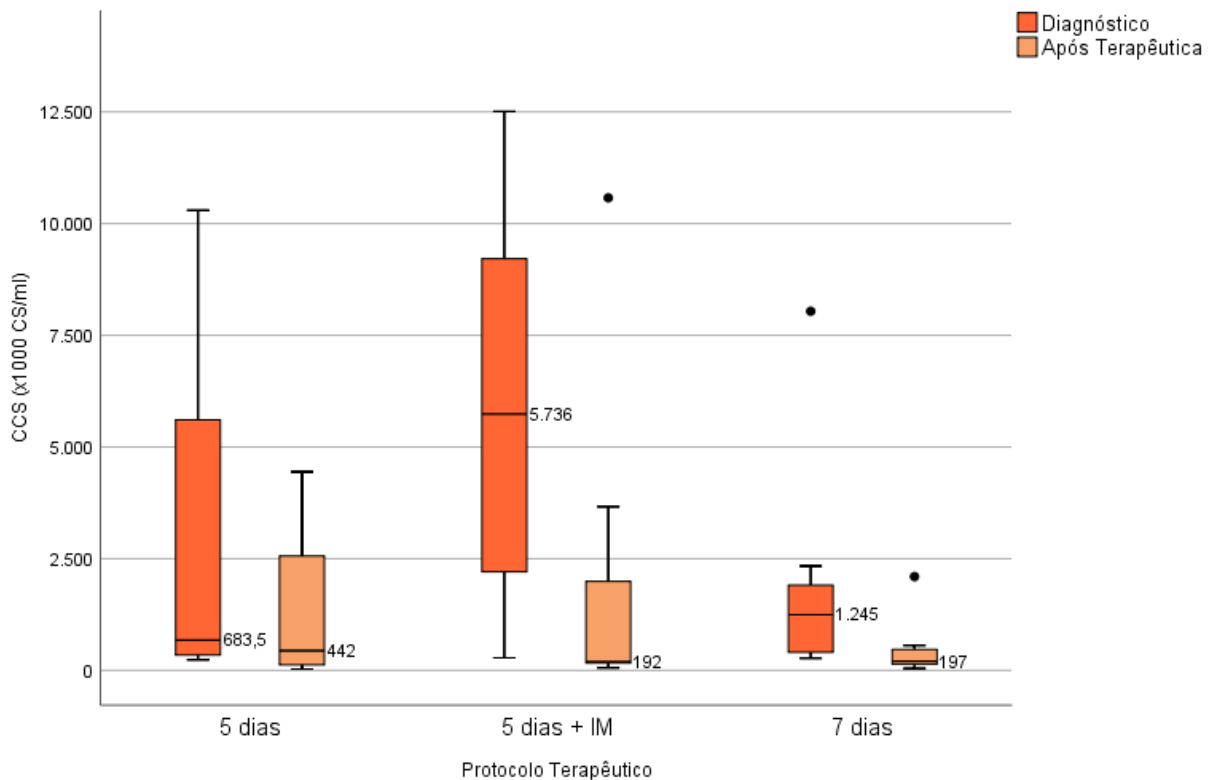
Gráfico 12 - Análise das CCS após cada protocolo terapêutico utilizado.



Numa comparação entre as CCS obtidas ao diagnóstico e após cada terapêutica, é possível afirmar que em todos os protocolos se verificou uma descida nos valores de CCS, verificando-se que no tratamento de benzilpenicilina intramamária com duração de sete dias, a mediana sofreu uma diferença de 1 048 000 CS/ml; na mesma terapêutica com uma

duração de cinco dias, a diferença foi de 246 000 CS/ml; e na terapia com adição de ampicilina intramuscular, a diferença na mediana foi de 5 544 000 CS/ml. Logo, no protocolo com a combinação de benzilpenicilina IMM e ampicilina IM foi notória uma diminuição nos valores das CCS após tratamento muito superior à dos restantes protocolos terapêuticos. Também é possível constatar esta diferença significativa nas CCS do leite das vacas ao diagnóstico e após a terapêutica, não só neste protocolo como no de duração de sete dias, já que a mediana após tratamento é inferior ao valor mínimo aquando do diagnóstico (281 000 CS/ml e 273 000 CS/ml, respetivamente). Quanto ao tratamento com duração de cinco dias apenas IMM, a diferença nos valores encontrados ao diagnóstico e após a terapêutica não é tão significativa, contudo a diminuição na dispersão dos valores após terapêutica permite afirmar que esta diminuição existe (gráfico 13).

Gráfico 13 - Comparação entre as CCS aquando do diagnóstico e após terapêutica, nos vários protocolos em estudo.



Através dos dados recolhidos em relação ao número de lactações de cada animal, foi perceptível que as vacas primíparas alcançaram uma taxa de cura de 100%, enquanto que das múltíparas apenas 42,1% atingiram a cura clínica (gráfico 14). Verificou-se, ainda, segundo o teste exato de Fisher ($\alpha = 0,05$), que não houve evidência estatística para afirmar que existe uma associação entre a resposta à terapêutica e a paridade do animal, uma vez que o resultado obtido foi 4,635, implicando um $p = 0,214$ ($p > 0,05$) (tabela 4 e anexo 3).

Gráfico 14 - Taxa de cura clínica em relação à paridade do animal.

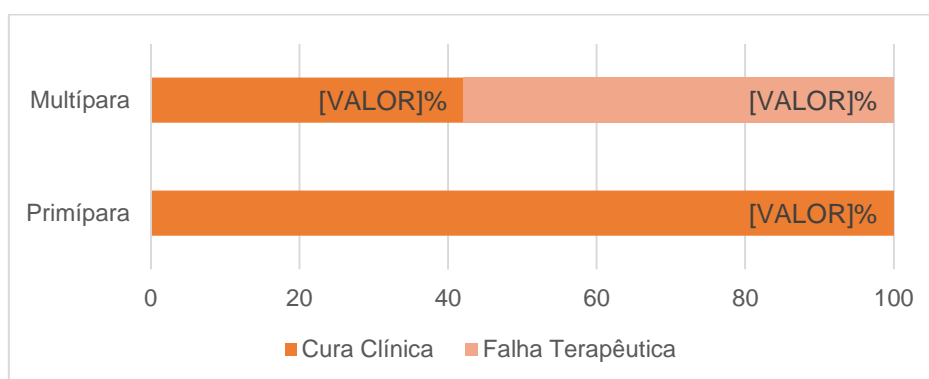


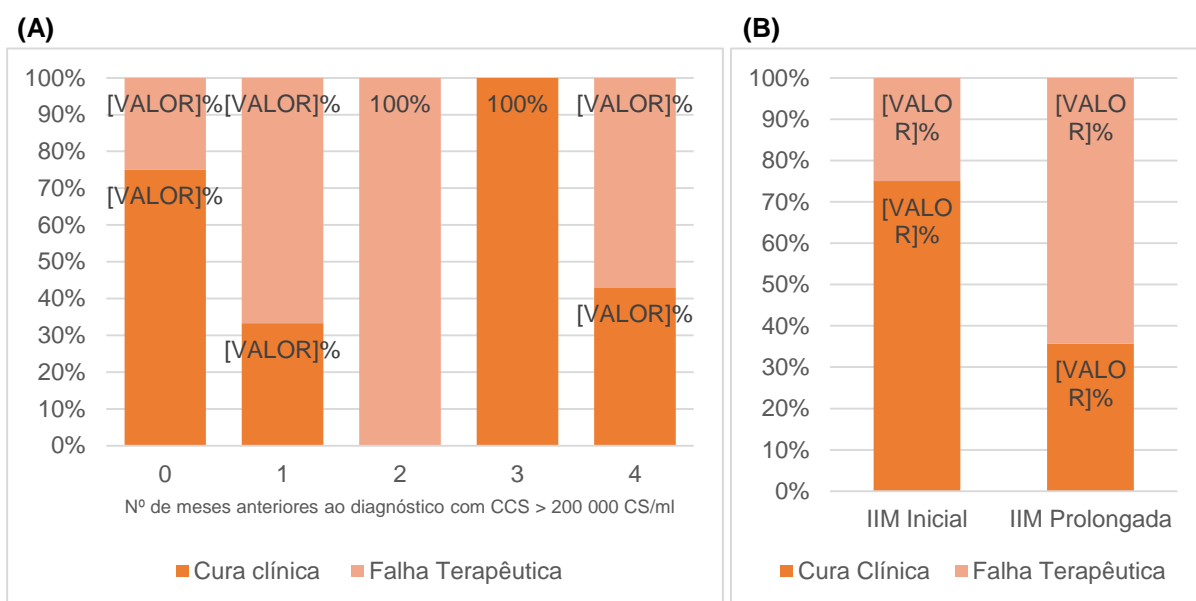
Tabela 4 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com a paridade do animal.

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	3,474 ^a	1	,062	,214
Razão de verossimilhança	1,544	1	,214	,214
Teste Exato de Fisher	4,635	----	-----	,214
N de Casos Válidos	22	----	-----	-----

a. 2 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 1,50.

Relativamente à relação entre a cura clínica obtida e a possível duração de infecção, observou-se que nas mamites iniciadas aquando do diagnóstico 75% dos casos atingiram a cura, ao contrário das infeções com durações de um e quatro meses que apenas obtiveram 33,3% e 42,9% de casos curados, respetivamente. Nas mamites com duração de três meses a cura clínica foi total, enquanto que em infeções com dois meses a mesma foi nula (gráfico 15A). Em suma, as infeções com CCS superiores a 200 000 CS/ml nos meses anteriores ao diagnóstico, ou seja, IIM prolongadas, apresentaram uma taxa de cura mais baixa, 35,7%. Já as infeções que se iniciaram aquando do diagnóstico obtiveram uma taxa de cura clínica de 75% (gráfico 15B).

Gráfico 15 - Taxa de cura clínica em relação à duração da infecção.



Segundo o Teste exato de Fisher, não existiu qualquer evidência estatística para afirmar que há uma associação entre a resposta à terapêutica e a duração da infecção, uma vez que o resultado obtido foi 6,023, implicando um $p = 0,173$ ($p > 0,05$; tabela 5 e anexo 3).

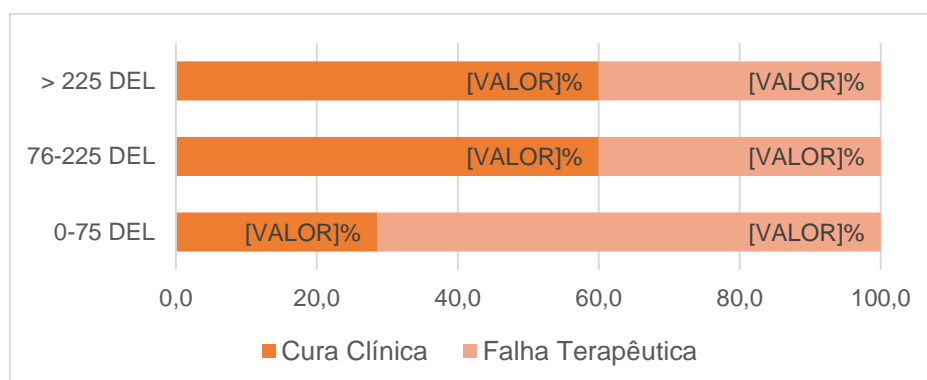
Tabela 5 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre a resposta terapêutica e a duração da infecção.

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	6,476 ^a	4	,166	,173
Razão de verossimilhança	8,121	4	,087	,173
Teste Exato de Fisher	6,023	----	-----	,173
N de Casos Válidos	22	----	-----	-----

a. 10 células (100,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é ,50.

A fase de lactação de cada animal com mamite por *S. uberis* foi, igualmente, estudada, permitindo afirmar que a cura clínica foi atingida por 28,6% dos animais que estavam entre 0 e 75 dias em leite, por 60% dos animais entre 76 e 225 dias de lactação e, também, por 60% dos animais com mais de 225 dias em leite (gráfico 16).

Gráfico 16 - Taxa de cura clínica em cada fase de lactação.



Verificou-se, ainda, segundo o teste exato de Fisher ($\alpha = 0,05$), que não houve evidência estatística para afirmar que existe uma associação entre a resposta à terapêutica e a fase de lactação do animal, uma vez que o resultado obtido foi 1,875, implicando um $p = 0,542$ ($p > 0,05$) (tabela 6 e anexo 3).

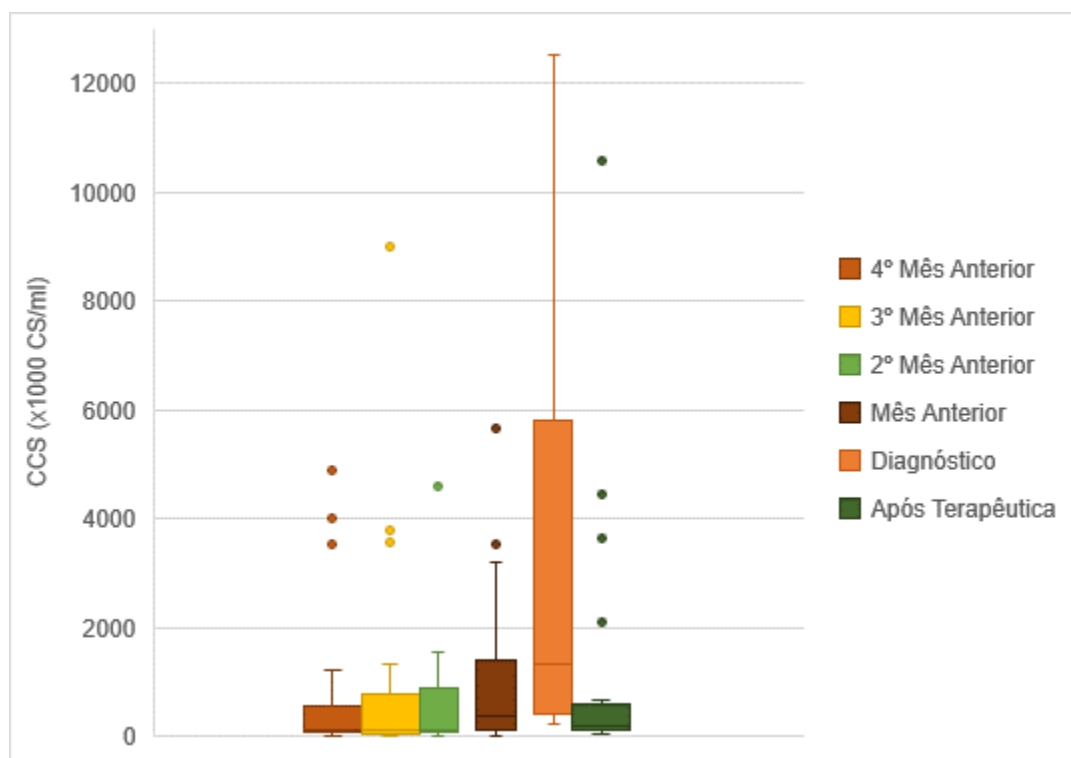
Tabela 6 - Resultado do teste exato de Fisher para associação da cura clínica com as diferentes fases de lactação do animal.

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,886 ^a	2	,390	,542
Razão de verossimilhança	1,932	2	,381	,542
Teste Exato de Fisher	1,875	----	-----	,542
N de Casos Válidos	22	----	-----	-----

a. 4 células (66,7%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,50.

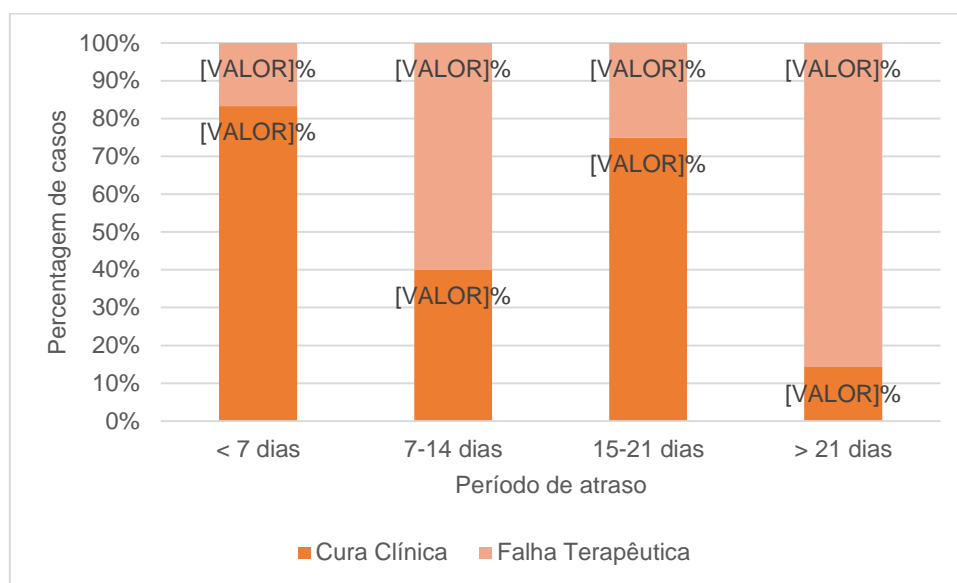
Por fim, com vista a obter um panorama geral da evolução da infecção por *S. uberis*, desde os 4 meses anteriores à mamite até ao fim do tratamento, foi elaborado um diagrama de extremos e quartis (gráfico 17). Assim, é possível constatar que, na totalidade, após a terapêutica verificou-se uma diminuição significativa das CCS, sendo a mediana ainda menor que a encontrada no mês anterior ao diagnóstico da mamite (204 500 CS/ml < 388 000 CS/ml). Também se observa a existência de uma assimetria positiva após terapêutica, bem como uma grande diminuição no valor máximo e na dispersão dos valores em relação aos verificados no mês anterior ao diagnóstico.

Gráfico 17 - Comparação dos valores das CCS no leite ao longo de toda a evolução da mamite por *S. uberis* e posterior terapêutica.



Uma vez que o período para averiguação da resposta terapêutica aos protocolos em estudo foi bastante variável, por estar dependente do contraste leiteiro disponibilizado, procedeu-se à análise da influência deste tempo nos resultados obtidos. Deste modo, observou-se que quando os resultados foram avaliados com menos de 7 dias de atraso, em relação aos 14 dias após o término do tratamento, a cura clínica foi atingida por 83,3% dos casos de mamite por *S. uberis*; quando este atraso estava entre os 7 e os 14 dias a cura clínica obtida foi de 40%; no período de atraso entre 15 e 21 dias a taxa foi de 75% e quando a avaliação foi feita com mais de 21 dias de atraso, apenas 14,3% dos casos atingiram a cura clínica (gráfico 18).

Gráfico 18 - Taxa de cura clínica obtida consoante o tempo de atraso na análise dos resultados.



Segundo o Teste exato de Fisher, não foi possível obter evidência estatística para afirmar que existe uma associação entre a resposta à terapêutica e o tempo decorrido entre os 14 dias após o término da terapêutica e o contraste contabilizado para análise da resposta ao tratamento, uma vez que o resultado obtido foi 7,083, implicando um $p = 0,062$ ($p > 0,05$; tabela 7 e anexo 3).

Tabela 7 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre a resposta à terapêutica e o tempo de atraso na avaliação dos resultados.

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	7,438 ^a	3	,059	,057
Razão de verossimilhança	8,121	3	,044	,093
Teste Exato de Fisher	7,083	----	-----	,062
N de Casos Válidos	22	----	-----	-----

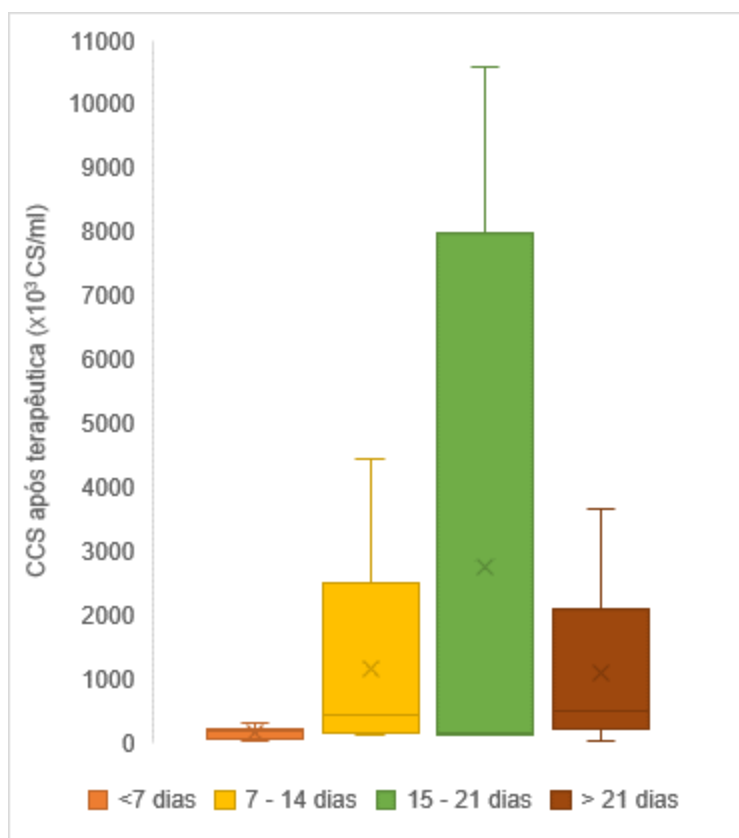
a. 8 células (100,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,00.

Quanto à influência deste período de atraso nos valores de CCS obtidos após o tratamento, foi possível aferir que quando o tempo de atraso foi inferior a 7 dias a mediana destes valores foi de 185 500 CS/ml, enquanto que no intervalo de 7 a 14 dias esta foi de 449 000 CS/ml, no de 15 a 21 dias foi de 164 500 CS/ml e, por fim, no intervalo com tempo de atraso superior a 21 dias a mediana foi de 489 000 CS/ml (tabela 8). Na avaliação da resposta terapêutica com períodos de atraso inferiores a 7 dias pôde verificar-se uma dispersão mínima de valores, enquanto que nos períodos mais longos estes valores estão mais dispersos, com especial atenção para o período de atraso de 15 a 21 dias que apresenta uma assimetria positiva acentuada, demonstrando que os valores superiores à mediana estão bastante dispersos (gráfico).

Tabela 8 - Valores das CCS encontrados após a terapêutica consoante os diferentes tempos de atraso de análise dos resultados.

Período de Atraso	CCS ($\times 10^3$ CS/ml)			
	Mediana	50% dos valores	Mínimo	Máximo
< 7 dias	185,5	50 – 228	32	321
7 – 14 dias	449	144 – 2 501,5	136	4 446
15 – 21 dias	164,5	115,25 – 7 979,25	108	10 575
> 21 dias	489	212 – 2 099	44	3 663

Gráfico 19 - Comparação dos valores das CCS encontradas após a terapêutica consoante os diferentes tempos de atraso de análise dos resultados.



7. Discussão

7.1. Epidemiologia

O setor leiteiro tem-se defrontado com grandes adversidades, sendo fundamental maximizar os lucros obtidos pela produção e, portanto, ter em vista o controlo e a diminuição no número de mamites, uma vez que estas são um dos grandes responsáveis por elevados prejuízos. Assim, a caracterização de IIM por *S. uberis* é muito importante para o desenvolvimento de estratégias que visem a redução da sua prevalência em explorações leiteiras.

No estudo efetuado, de entre as análises processadas no laboratório da Proleite, *S. uberis* apresentou uma prevalência de 5,8%, revelando ser a segunda bactéria mais identificada, como é visível no gráfico 2A. Também em Portugal, na zona Ribatejo-Oeste, Bexiga et al. (2005) encontrou uma prevalência de 7,4% de mamites por *S. uberis*, enquanto que em Inglaterra e no País de Gales o valor obtido por Bradley et al. (2007) foi de 23,5%; na Finlândia, segundo Heikkilä et al. (2018), esta prevalência foi de 8,4%; na Nova Zelândia foi de 11,7% (McDougall et al. 2004); e no Canadá de 6,3% (Riekerink et al. 2008). Deste modo, é possível afirmar que *S. uberis*, nesta região centro litoral portuguesa, se encontra numa prevalência mais próxima da do Canadá, contudo, de uma forma geral, apresenta um valor inferior ao relatado noutros estudos (tabela 9). Uma possível justificação para estes resultados poderá ser o facto deste agente etiológico ser mais prevalente em sistemas à base de pastagem, como na Nova Zelândia, enquanto que em Portugal continental, em grande parte dos sistemas de produção, os animais têm pouco acesso a pastagem (Douglas et al. 2000; Rato et al. 2008). A variação nas taxas de prevalência poderá, também, dever-se a diferentes métodos de recolha de amostras, à variabilidade dos efetivos, aos processos de diagnóstico e a diversas técnicas de isolamento e caracterização do agente. Neste caso, o facto de as amostras serem baseadas no envio voluntário de cada produtor poderá influenciar o resultado obtido, uma vez que apenas os produtores inseridos em programas de qualidade de leite ou com sensibilidade para a importância da identificação do agente etiológico de mamites terão enviado amostras para análise, podendo então a taxa de prevalência de *S. uberis* na zona estudada ser mais elevada.

Ao longo dos anos, a prevalência de *S. uberis* demonstrou-se decrescente no que toca às amostras analisadas no laboratório da Proleite, passando de 8,5%, em 2016 para 5,8% no ano de 2019. Possivelmente, este decréscimo refletirá a atenção crescente que este agente suscitou, assim como todos os esforços desenvolvidos no âmbito da qualidade do leite e no tratamento e refugo destes animais quando apropriado. Porém, poderá ser um decréscimo fictício, já que muitos dos produtores, ao ter conhecimento de que este agente está presente na sua exploração, poderão não enviar amostras de leite de vacas com

mamite para identificação microbiológica, diminuindo assim a prevalência ao longo do tempo.

Tabela 9 - Comparação das prevalências de *S. uberis* em vacas diagnosticadas com mamite, em diferentes estudos e países.

	País	Prevalência
(Bexiga et al. 2005)	Portugal (Ribatejo-Oeste)	7,4%
(Bradley et al. 2007)	Inglaterra e País de Gales	23,5%
(Heikkilä et al. 2018)	Finlândia	8,4%
(McDougall et al. 2004)	Nova Zelândia	11,7%
(Riekerink et al. 2008)	Canadá	6,3%
Resultado obtido	Portugal (Centro Litoral)	5,8%

Quanto às resistências aos agentes antimicrobianos, trimetropim-sulfametoxazol foi o fármaco a que os isolados de *S. uberis* identificados apresentaram maior percentagem de resistências, seguindo-se enrofloxacina, cloxacilina, danofloxacina e marbofloxacina. Segundo McDougall et al. (2014), também trimetropim-sulfametoxazol é o antimicrobiano que apresenta maior percentagem de resistências (12,6%), porém numa proporção inferior à encontrada neste estudo (50%). Uma possível explicação para o valor significativo de resistências encontrado para este princípio ativo poderá ser a sua elevada utilização em protocolos terapêuticos, maioritariamente para patologias gastrointestinais (Rocha et al. 2014). As elevadas taxas de resistência encontradas em relação a enrofloxacina, danofloxacina e marbofloxacina poderão ser justificadas pela presença de resistências intrínsecas a quinolonas por parte dos isolados do género *Streptococcus*, referidas por Boireau et al. (2018). Dos antimicrobianos utilizados nos testes de sensibilidade a antibióticos, vários pertencem à classe das penicilinas, como o penetamato – um pró-fármaco a partir do qual a benzilpenicilina é libertada por hidrólise –, ampicilina e penicilina. Deste modo, poderá ser possível afirmar que a sensibilidade encontrada quanto às penicilinas comprovou que estas poderão ser um bom princípio ativo no combate ao *S. uberis*, tendo sido observado apenas 1,5% de amostras com resistência a penetamato, 5,7% a ampicilina e nenhuma com resistência a penicilina. McDougall et al. (2014) obteve resultados semelhantes, demonstrando que 99% dos isolados de *S. uberis* apresentavam suscetibilidade a penicilina e que todos eram suscetíveis a ampicilina, assim como Pitkälä et al. (2008), que revelou taxas de resistência de 0% a penicilina (tabela 10). Já Thomas et al. (2015) demonstra que alguns isolados de *S. uberis* (29,8%) possuem uma suscetibilidade intermédia a penicilina, o que está em concordância com os resultados obtidos que demonstram, igualmente, alguns isolados nesta condição (14,3%). Rocha et al. (2014), num estudo efetuado em Portugal corrobora também tudo isto, já que além de verificar que para o género *Streptococcus* os níveis de resistência a grande parte dos β -lactâmicos são inferiores a 1%, demonstra também que existem taxas elevadas de resistência a cloxacilina

(22,1%), possivelmente por este β -lactâmico ser bastante utilizado em Portugal como terapia em IIM tanto durante a lactação, como no período seco.

Tabela 10 - Comparação das percentagens de resistência aos antimicrobianos da classe das penicilinas, apresentadas por *S. uberis* em vários estudos.

Resistências encontradas	Pitkälä et al. 2008	McDougall et al. 2014	Rocha et al. 2014	Thomas et al. 2015	Resultado obtido
Ampicilina	-----	0%	-----	-----	5,7%
Penetamato	-----	-----	-----	-----	1,5%
Penicilina	0%	1,0%	0,4%	0%	0%

No que concerne à fase de lactação em que as mamites por *S. uberis* ocorrem, os resultados obtidos – a maior prevalência de infeção em animais com mais de 225 dias em leite e, seguidamente, nos primeiros 75 dias de lactação –, correspondem aos estudos anteriormente publicados. Como descrito por Jayarao et al. (1999) e Khan et al. (2003), estas infeções são, frequentemente, encontradas no período que antecede a secagem ou no periparto. As mamites diagnosticadas numa fase de lactação inicial são, usualmente (56% dos casos clínicos por *S. uberis*, segundo Wilkinson (2003)), consequência de infeções adquiridas durante o período seco, exibindo sinais clínicos apenas na lactação seguinte (Kromker et al. 2014). Este padrão é visível nos resultados obtidos, uma vez que 77,3% dos casos foram diagnosticados tanto em períodos imediatamente anteriores, como imediatamente posteriores à secagem. Uma possível explicação para estes resultados é o facto de *S. uberis* possuir, aquando do período seco, uma capacidade superior de penetração no ducto mamário, já que existe uma maior suscetibilidade por parte da glândula mamária (Leigh 1999). Também a interação deste agente com as lactoferrinas, presentes nesta fase de lactação, propicia o seu desenvolvimento e permite uma resistência aos mecanismos de defesa inatos (Fang e Oliver 1999; Santos et al. 2007; Patel et al. 2009; Almeida et al. 2015).

A paridade dos animais infetados por *S. uberis* neste estudo, apresenta uma média superior a três lactações, sendo demonstrado que 86,4% das vacas são multíparas. Em concordância com Jayarao et al. (1999) e Zadoks et al. (2001), indica, então, que animais com uma paridade avançada são mais suscetíveis a este tipo de IIM, já que segundo Samson et al. (2016), com o envelhecimento ocorre uma redução da eficácia da resposta imunitária. Quanto ao número de quartos mamários afetados, grande parte dos casos, apresentaram infeção num só quarto (45,5%) ou nos quatro quartos mamários (31,8%). Segundo Zadoks, Allore, Barkema, Sampimon, Gröhn, et al. (2001), as proporções de novas IIM resultantes de infeções cruzadas entre quartos mamários são pequenas em relação a novas IIM resultantes de transmissão vaca a vaca. Todavia, verificou-se que num número significativo de casos os quatro quartos mamários foram afetados, podendo indicar que

existe alguma transmissão entre tetos. No entanto, este estudo não permite averiguar quais as vias de transmissão de cada IIM, não ficando clara a asserção feita anteriormente.

Numa análise aos registos obtidos referentes às CCS do leite dos animais aquando do diagnóstico de mamite por *S. uberis*, foi possível constatar que os valores são bastante elevados, tal como afirmado por Smith (2015), encontrando-se 50% num intervalo entre 413 000 e 5 822 500 CS/ml. Este facto poderá dever-se à grande capacidade deste agente etiológico para danificar o epitélio mamário, à grande inflamação que é capaz de gerar e à utilização do leite para promover a sua multiplicação (Woolford et al. 1998). Também a resposta imunitária ineficiente, ou seja, a falta de capacidade dos neutrófilos para prevenir a multiplicação bacteriana, resultam em valores elevados de CS no leite (Smith 2015). Segundo Djabri et al. (2002), o intervalo de valores encontrado nestes casos é de 851 000 a 1 085 000 CS/ml, estando este compreendido no intervalo obtido neste estudo que apresenta CCS com um mínimo de 237 000 CS/ml e um máximo de 12 513 000 CS/ml. Já a média apresentada por Djabri et al. (2002) é de 2 065 000 CS/ml, demonstrando que a média obtida (3 276 000 CS/ml) se apresenta um pouco acima. A alta dispersão de valores encontrada poderá ser justificada pela influência de vários fatores que afetam, também, a variação das CS encontradas no leite destes animais, como a raça, paridade e fase de lactação do animal, os métodos de recolha e armazenamento das amostras, a época do ano e os fatores ambientais e de manejo (Djabri et al. 2002; De Haas et al. 2002; Bradley and Green 2005; Sharif and Muhammad 2008). A presença de valores mais baixos poderá dever-se a possíveis tratamentos aplicados que não foram bem-sucedidos, mas que poderão ter contribuído para uma diminuição das células somáticas no leite.

Através do historial das CCS no leite dos animais em estudo, foi possível verificar uma tendência crescente desde o quarto mês anterior à infeção até ao segundo, porém no mês imediatamente anterior, este aumento demonstrou-se um pouco mais significativo e aquando do diagnóstico verificou-se um incremento notório. De Haas et al. (2002), num estudo sobre a variação da CCS ao longo de uma lactação com mamite clínica, comprovou que em infeções por *S. uberis* existe um aumento contínuo nos dias anteriores à manifestação de mamite, no entanto este aumento não é equivalente ao estudado, uma vez que apenas foram analisadas alterações a nível mensal e não diariamente, como De Haas et al. (2002). A presença de valores superiores a 200 000 CS/ml consistentemente nos vários meses anteriores à IIM, assim como a existência de vários *outliers* nos mesmos, poderá sugerir que algumas das mamites diagnosticadas, já estariam presentes sob a forma de mamite subclínica, corroborando a ideia de que *S. uberis* induz uma infeção prolongada e persistente (Milne et al. 2005; Heikkilä et al. 2018). A sua persistência no úbere, que justifica a presença de uma infeção crónica e recorrente, deve-se à sua capacidade para resistir à fagocitose, tanto através da formação de cápsulas de ácido hialurónico como de biofilme, e

à sua aptidão para proceder à internalização nos leucócitos – pela presença das proteínas PauA e PauB e formação de hialuronidase livre (Khan et al. 2003; Segura and Gottschalk 2004; Kromker et al. 2014; Gomes et al. 2016; Wentz et al. 2019).

Através da análise dos meses anteriores com CCS elevadas em cada caso diagnosticado, foi possível aferir que grande parte das mamites identificadas com *S. uberis* (63,5%) poderão corresponder a infeções com uma duração prolongada. Assim, confirma-se que os fatores de virulência já mencionados e as capacidades do agente etiológico daí resultantes permitem o estabelecimento de infeções crónicas da glândula mamária. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Kromker et al. (2014) que demonstra que tanto podem existir infeções por *S. uberis* com durações relativamente pequenas, como infeções por períodos longos, desde dois a 20 meses.

7.2. Protocolos Terapêuticos

S. uberis é um agente etiológico de mamites que, devido à sua epidemiologia e a todos os fatores de virulência que dispõe, demonstra ser um grande motivo de frustração nas explorações leiteiras. Muitas das medidas clássicas de controlo de mamites revelam-se ineficazes contra este agente e existe uma grande dificuldade no seu processo de cura (Douglas et al. 2000; Bradley 2002; Wentz et al. 2019).

É nesta linha que se insere a pesquisa efetuada com vários protocolos terapêuticos à base de benzilpenicilina procaínica IMM, com vista a averiguar protocolos que possam ser eficazes e rentáveis para o produtor. Daí a necessidade de incluir um protocolo com duração normal (cinco dias), para que seja possível associar a taxa de cura clínica a um menor custo para o produtor, tanto no tratamento como na rejeição do leite afetado. Para determinação da cura clínica foi escolhido um limiar de 200 000 CS/ml, em amostras de leite compostas ao nível da vaca, uma vez que este valor garante uma boa combinação entre sensibilidade e especificidade (Bradley e Green 2005).

Os resultados obtidos indicam que a terapia com duração de cinco dias associada a ampicilina IM apresentou uma taxa de cura mais elevada (57,1%) que os protocolos alternativos. Neste protocolo, a associação da administração IM visa uma maior penetração no parênquima mamário (Pyörälä 2009), tendo sido aplicado com o intuito de proporcionar uma maior taxa de cura, uma vez que o agente procede à colonização do mesmo. Todavia, os resultados obtidos não demonstraram grande vantagem com esta associação, já que a taxa de cura clínica verificada foi semelhante à da terapia apenas IMM com duração de sete dias (54,5%). Estudos que visam a comparação da aplicação de terapêutica local com sistémica para *S. uberis* indicam que não existe realmente uma diferença significativa, quanto à taxa de cura obtida, entre ambos os tipos de terapia (Hillerton e Kliem 2002; Sérieys et al. 2005; Sandgren et al. 2008; Kalmus et al. 2014).

A taxa obtida com a terapêutica de sete dias vai, então, de encontro ao que está descrito em relação a *S. uberis*, como Pyörälä (2009) que sugere tratamentos prolongados; Hillerton e Kliem (2002) que demonstram que uma terapêutica IMM de penetamato (pró-fármaco que liberta benzilpenicilina por hidrólise) com estreptomina, num período de seis dias, obtém resultados de 100% de cura clínica e Constable et al. (2017) que sugere igualmente tratamentos prolongados, de cinco a oito dias, com utilização de penetamato IMM, a cada 24 horas. Também o facto da benzilpenicilina procaínica ser um antibiótico de ação prolongada e, portanto, tempo-dependente, poderá ser uma vantagem neste protocolo, pois permite uma ação inibitória com maior eficiência quando utilizada por longos períodos. A baixa taxa de cura clínica encontrada na terapia IMM com duração de apenas cinco dias (25%) corrobora também a necessidade de um tratamento mais prolongado. Deste modo, na terapêutica combinada, talvez um prolongamento do protocolo para sete ou oito dias seja o ideal para atingir uma taxa de cura clínica mais elevada. Contudo, a definição de cura utilizada neste estudo poderá ter demonstrado uma vantagem quanto a este protocolo, uma vez que foi aferida ao nível da vaca, e no caso de existir uma mamite noutra quarto mamário por outro agente etiológico esta permitiria uma redução das CCS em todos os quartos.

Apesar de tudo, o teste exato de Fisher aplicado para verificação de uma possível associação entre a cura clínica atingida e o protocolo terapêutico utilizado não permitiu identificar qualquer evidência estatística. Na totalidade dos casos em estudo, a taxa de falha terapêutica foi de 50%, uma percentagem um pouco elevada, em comparação com outros estudos, como Hillerton e Kliem (2002) que obtiveram 0% de falha terapêutica e Kalmus et al. (2014) que com uma terapêutica à base de benzilpenicilina, durante cinco dias, tanto IM como IMM, atingiu taxas de falha terapêutica de 15% e 31,2%, respetivamente. Esta desigualdade encontrada poderá dever-se às diferentes definições de cura clínica estipuladas por cada estudo. Porém, as taxas de cura serão influenciadas pela presença de inúmeros fatores de virulência por parte deste agente que permitem uma evasão aos procedimentos antimicrobianos, tais como, a formação de cápsulas de ácido hialurónico (Segura and Gottschalk 2004) e de biofilme (Varhimo et al. 2011; Gomes et al. 2016). Também a presença deste agente nos vasos linfáticos e linfonodos, assim como a formação de fibrose durante estas mamites, poderão contribuir para a fraca resposta ao tratamento (Samson et al. 2016). Além disso, o facto da benzilpenicilina procaínica apresentar apenas uma difusão moderada pelo tecido mamário, quando aplicada intracisternamente (Divers e Peek 2008; Constable et al. 2017), e de apenas atingir concentrações intracelulares moderadas (Plumb 2011; Riviere e Papich 2018) poderá ter limitado, também, as taxas de cura clínica atingidas nestas mamites por *S. uberis*.

O método escolhido para analisar a resposta aos protocolos aplicados foi a CCS, 14 dias após o término da terapêutica, uma vez que a IMM tem sido reconhecida como o

principal fator influenciador do número de CS no leite (Milne et al. 2005). Assim, através de um registo das CS aquando do diagnóstico e após a terapêutica foi possível visualizar as alterações resultantes de cada protocolo. Na terapia de benzilpenicilina procaínica IMM com duração de sete dias foi possível constatar uma diminuição significativa, pois a mediana registada após tratamento (197 000 CS/ml) é inferior ao valor mínimo obtido aquando do diagnóstico (273 000 CS/ml), assim como no protocolo à base de terapia combinada, o que coincide com o facto de estes terem sido os protocolos com maior taxa de cura clínica. Porém, é visível que os valores de CCS aquando do diagnóstico das vacas submetidas a estes dois protocolos são bastante diferentes, na terapia com associação de ampicilina IM estes valores são mais elevados e dispersos, enquanto que no tratamento com duração de sete dias, os valores são mais baixos. Portanto, é possível constatar que os resultados apresentados estão em concordância com Deluyker et al. (2005), que demonstra que não há evidência de que os valores de CCS aquando do diagnóstico determinem a taxa de falha terapêutica, já que ambos os protocolos atingiram taxas semelhantes.

Outros fatores que podem estar implicados na taxa de cura clínica são a paridade e a raça do animal (Sandgren et al. 2008). No que diz respeito à paridade, foi perceptível que vacas múltiparas têm uma maior taxa de falha terapêutica (57,9%), estando de acordo com Deluyker et al. (2005), Sandgren et al. (2008) e Samson et al. (2016) que verificam menores taxas de cura em vacas com maior número de lactações. Segundo Samson et al. (2016), as possíveis razões para que este seja um fator limitante, apesar de não comprovadas, são o aumento do volume do úbere com a idade, o que levaria a uma menor dose de antibiótico por volume de tecido mamário, e a deterioração natural do sistema imunitário, promovida pelo envelhecimento. Contudo, os resultados obtidos não demonstram qualquer evidência estatística de que existe uma associação entre a resposta terapêutica e o número de lactações do animal. A duração de infeção é, igualmente, um fator que interfere com a taxa de cura clínica obtida, tendo sido demonstrado que IIM prolongadas atingem taxas de cura clínica mais baixas (35,7%). Tal como descrito por Samson et al. (2016), que afirma que infeções sem CCS elevadas antes do diagnóstico têm maior probabilidade de atingir a cura, as IIM que se iniciaram aquando do diagnóstico obtiveram uma taxa de cura mais elevada (75%). Contudo, o teste exato de Fisher elaborado não demonstra evidência estatística de que existe uma associação entre a taxa de cura clínica obtida e a duração da infeção.

A associação entre a fase de lactação de cada vaca aquando do diagnóstico de mamite por *S. uberis* com a resposta terapêutica obtida foi também avaliada, porém, mais uma vez, não foi atingida qualquer evidência estatística. Uma maior taxa de cura clínica foi atingida entre os 76 e 225 dias em leite (60%), bem como após os 225 dias (60%), enquanto que no início da lactação apenas 28,6% foram capazes de a atingir. Esta baixa taxa obtida nos primeiros 75 dias em leite poderá estar relacionada com o facto de este ser o período do

pico de produção (Deluyker et al. 2005), existindo uma eliminação de antibiótico mais célere, o que impede a ação prolongada necessária nesta terapêutica.

Na totalidade dos casos diagnosticados com mamite por *S. uberis* e incluídos no estudo apresentado, os valores de CCS após terapêutica diminuíram bastante em relação aos valores aquando do diagnóstico e aos do mês anterior ao mesmo. Contudo, encontram-se sensivelmente mais de 50% dos valores acima das 200 000 CS/ml, o que corrobora Constable et al. (2017) que descreve que mamites por *S. uberis* apresentam valores elevados durante 4 meses após tratamento. Assim, as taxas de falha terapêutica obtidas poderão estar inflacionadas visto que o período utilizado para avaliação da resposta ao tratamento poderá ter sido muito curto. Existe, ainda, possibilidade, segundo Hillerton e Kliem (2002), de que a falha na recuperação ao nível das CS presentes no leite se deva, não a uma infeção persistente, mas sim a danos residuais do epitélio mamário.

O período que decorreu entre os 14 dias após o término do tratamento e a avaliação real da resposta à terapêutica através do contraste leiteiro disponibilizado poderá ter tido também uma influência na taxa de cura atingida e consequentemente nas CCS obtidas após o tratamento. Apesar do teste exato de Fisher elaborado não ter permitido evidência estatística para assumir uma relação entre a resposta à terapêutica e o tempo de atraso na avaliação da mesma, quando esta avaliação aconteceu com um período de atraso inferior a sete dias a taxa de cura clínica atingida foi superior (83,3%) à obtida em qualquer outro período de atraso mais prolongado. Também o aumento dos valores de CCS foi notório em períodos de avaliação mais tardios, ou seja, com tempos de atraso superiores. Estes resultados poderão sugerir que os protocolos terapêuticos aplicados terão provocado uma remissão ou eliminação da infeção, contudo esta não foi definitiva. Duas hipóteses para o retorno a CCS elevadas são o facto de não se ter atingido uma cura bacteriológica e assim, o agente voltar a causar infeção, e a possibilidade de existir uma reinfeção pelo mesmo agente etiológico ou por outro, já que, segundo Kromker et al. (2014), após a cura de uma IIM por *S. uberis*, existe um maior risco de reinfeção.

7.3. Limitações do Estudo e Sugestões

A principal limitação encontrada na elaboração deste estudo foi o tamanho da amostra utilizada, pois o número de casos diagnosticados no período estipulado foi muito reduzido. Uma amostra superior permitiria não só uma interpretação dos dados mais consistente, como uma análise estatística mais fiável, com evidência de possíveis associações. Também quanto à amostragem, o acesso às amostras de leite dependia da sua submissão pelos produtores, o que acabou por ser uma condicionante no que toca à origem das amostras e, portanto, poderá não fornecer uma imagem real da prevalência de *S. uberis* na área em estudo. A utilização dos valores das CCS ao nível da vaca para

avaliação da cura poderá ser, por si só, uma limitação, uma vez que este é apenas um indicador do estado da infeção e não permite perceber se o agente foi eliminado, ou seja, se o animal atingiu uma cura bacteriológica. Ainda em relação ao método utilizado, o facto de o período para avaliação da cura estar dependente do contraste leiteiro disponibilizado poderá, igualmente, enviesar os resultados obtidos, já que estes períodos foram variáveis em todos os casos, apesar da avaliação ter sido sempre efetuada passados os 14 dias após a conclusão da terapêutica. Outra condicionante do estudo, pode ser a avaliação da duração de infeção através das CCS dos meses anteriores ao diagnóstico sem qualquer evidência de que estas seriam causadas por *S. uberis*.

Em trabalhos futuros seria interessante aprofundar este estudo e optar pela utilização da cultura microbiológica como método de avaliação com vista a colmatar uma das limitações apontadas e perceber se uma cura bacteriológica foi atingida após cada protocolo terapêutico. Deveriam ainda ser explorados mais princípios ativos para utilização na terapia de mamites por *S. uberis* e proceder à comparação das várias taxas de cura obtidas. Outra abordagem interessante seria a aplicação de diferentes protocolos terapêuticos com uma duração progressiva de 24 horas, entre os cinco e os oito dias, visando encontrar o melhor equilíbrio entre a taxa de cura obtida e o preço que o tratamento acarreta ao produtor.

Assim, um estudo com uma amostra superior, vários protocolos terapêuticos com diversos princípios ativos e com avaliação de taxas de cura bacteriológica seria uma mais-valia no auxílio ao tratamento de mamites por um dos agentes etiológicos mais frustrantes.

8. Conclusão

Apesar de toda a pesquisa e desenvolvimento de métodos de controlo para minimizar a ocorrência de mamites, esta continua a ser a doença mais importante a nível económico para as explorações leiteiras. Um dos principais fatores que contribuirá para o estabelecimento de medidas adequadas de controlo e tratamento de mastites é o conhecimento da epidemiologia e dos perfis de suscetibilidade dos vários agentes etiológicos, sendo fundamental a realização e publicação de estudos realizados em Portugal, de forma a encontrar estratégias economicamente viáveis para o produtor.

Deste modo, através do estudo realizado foi possível salientar alguns pontos importantes quanto a mamites diagnosticadas por *S. uberis*, já que é uma das bactérias mais identificadas. Contudo, o decréscimo anual verificado poderá indicar que está a ser feito um bom trabalho a nível de qualidade do leite, seja quanto a medidas de controlo, aplicação de tratamentos ou programas de refugo. O padrão de resistências encontrado vai de encontro ao já conhecido, demonstrando uma boa suscetibilidade em relação à classe das penicilinas. Também quanto à epidemiologia, não existem grandes discordâncias, tendo sido confirmado que as IIM por este agente se estabelecem no período que antecede a

secagem ou no periparto e que vacas múltiparas são mais suscetíveis que as vacas com apenas uma lactação. É ainda importante referir que se confirmou que estas mamites são acompanhadas de elevados valores de CCS, existindo um aumento subtil no mês anterior ao seu diagnóstico, e que, grande parte dos casos, são infeções persistentes.

O objetivo principal deste trabalho passou pela testagem de diferentes protocolos terapêuticos à base de benzilpenicilina procaínica IMM, com vista a travar infeções por *S. uberis*. Assim, foi perceptível que a terapia combinada com duração de cinco dias – benzilpenicilina procaínica IMM associada a ampicilina IM – teve uma influência muito positiva ao nível da diminuição das CS no leite das vacas afetadas, tal como o protocolo apenas IMM com duração de sete dias. Estes apresentam uma taxa de cura razoável, porém o tratamento IMM de cinco dias demonstrou-se insuficiente, com valores de CCS elevados. A paridade do animal poderá ter tido alguma influência nas taxas de cura atingidas, uma vez que animais múltiparos apresentaram taxas mais baixas. Após a aplicação das diferentes terapias foi visível ainda uma diminuição nas CS presentes no leite, todavia estas mantêm-se em valores elevados.

Em suma, é muito importante conhecer o agente etiológico aquando do diagnóstico de uma mamite, no entanto as recomendações quanto ao tratamento a aplicar devem ser baseadas também nas características de cada animal. Informações como a paridade, a fase de lactação e o historial a nível de CCS do animal poderão auxiliar na escolha da duração da terapia, permitindo um prognóstico mais realista e, desta forma, um custo mais fundamentado para o produtor.

9. Referências Bibliográficas

Almeida R, Gillespie B, Ivey S, Moorehead H, Lunn P, Dowlen H, Johnson D, Lamar K, Oliver S. 2003. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced streptococcus uberis intramammary infections in lactating dairy cattle. *Vet Ther.* 4(3).

Almeida RA, Kerro-Dego O, Prado ME, Headrick SI, Lewis MJ, Siebert LJ, Pighetti GM, Oliver SP. 2015. Protective effect of anti-SUAM antibodies on *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet Res.* 46(1).

Archer SC, Bradley AJ, Cooper S, Davies PL, Green MJ. 2017. Prediction of *Streptococcus uberis* clinical mastitis risk using Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in dairy herds. *Prev Vet Med.* 144:1–6.

Bexiga R, Cavaco LM, Vilela CL. 2005. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. *Rev Port Ciências Veterinárias.* 100:39–44.

Blowey RW, Edmondson P. 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds.* 2ª edição. United Kingdom (GB): CAB International.

Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraud J, Larriestra A, Reinoso E, Lasagno M, Ferrari M, Ducrós E, Frigerio C, et al. 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Sci Against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv.*(January):483–494.

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

Bradley A, Green M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In Pract.* 27(6):310–315.

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

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on diary farms in England and Wales. *Vet Rec.* 160(8):253–258.

Bramley AJ, Dodd FH. 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control--progress and prospects. *J Dairy Res.* 51(3):481–512.

Breen J, Hudson C, Green M, Bradley A. 2011. Combination therapy for mastitis in dairy herds: evidence and research. *Vet Times.* 41(20):8-12.

Cantón R, Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 35(5):977–991.

[CLSI] Clinical and laboratory standards institute. 2018. VET 08 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4ª edição. United States (US).

Collado R, Montbrau C, Sitjà M, Prenafeta A. 2018. Study of the efficacy of a

Streptococcus uberis mastitis vaccine against an experimental intramammary infection with a heterologous strain in dairy cows. *J Dairy Sci.* 101(11):10290–10302.

Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grunberg W. 2017. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* 11^a edição. Missouri (MO): Elsevier. Capítulo 20, Diseases of the mammary gland; p. 1904–2001.

Constable PD, Morin DE. 2003. Treatment of clinical mastitis. Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19(1):139–55.

Crowley RC, Leigh JA, Ward PN, Lappin-Scott HM, Bowler LD. 2011. Differential protein expression in *Streptococcus uberis* under planktonic and biofilm growth conditions. *Appl Environ Microbiol.* 77(1):382–384.

Deluyker HA, Van Oye SN, Boucher JF. 2005. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J Dairy Sci.* 88(2):604–614.

Divers TJ, Peek SF. 2008. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle.* 2^a edição. Missouri (MO): Saunders Elsevier. Capítulo 8, Diseases of the teats and udder; p. 327-394.

Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: A meta-analysis. *Vet Res.* 33(4):335–357.

Douglas VL, Fenwick SG, Pfeiffer DU, Williamson NB, Holmes CW. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 75(1):27–41.

Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 19(1):109–138.

Fang W, Oliver SP. 1999. Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett.* 176(1):91–96.

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

Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. 2016. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. Coenye T, editor. *Pathog Dis.* 74(3).

De Haas Y, Barkema HW, Veerkamp RF. 2002. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *J Dairy Sci.* 85(5):1314–1323.

Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. 2018. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 101(10):9493–9504.

Hillerton JE, Kliem KE. 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J Dairy Sci.* 85(4):1009–1014.

Hockett ME, Hopkins FM, Lewis MJ, Saxton AM, Dowlen HH, Oliver SP, Schrick FN. 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim Reprod Sci.* 58(3–4):241–251.

Jayarao BM, Gillespie BE, Lewis MJ, Dowlan HH, Oliver SP. 1999. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. *J Vet Med Ser B.* 46(7):433–442.

Kalmus P, Simojoki H, Orro T, Taponen S, Mustonen K, Holopainen J, Pyörälä S. 2014. Efficacy of 5-day parenteral versus intramammary benzylpenicillin for treatment of clinical mastitis caused by gram-positive bacteria susceptible to penicillin in vitro. *J Dairy Sci.* 97(4):2155–2164.

Kapil A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian J Med Res.* 121(2):83–91.

Kawai K, Shimazaki K, Higuchi H, Nagahata H. 2007. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health.* 54(3–4):160–164.

Kehrli ME, Shuster DE. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 77(2):619–627.

Khan IU, Hassan AA, Abdulmawjood A, Lämmler C, Wolter W, Zschöck M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J Vet Sci.* 4(3):213–223.

Klaas IC, Zadoks RN. 2018. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound Emerg Dis.* 65(April 2017):166–185.

Kromker V, Reinecke F, Paduch J-H, Grabowski N. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinic Microbiol.* 3(4).

Lam TJGM, Olde Riekerink RGM, Sampimon OC, Smith H. 2009. Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. *Ir Vet J.* 62(4):34–39.

Leigh JA. 1999. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J.* 157(3):225–238.

Lévesque P. 2004. Less mastitis, better milk. Québec (QC): Institut de technologie agroalimentaire.

Li M, Gehring R, Riviere JE, Lin Z. 2018. Probabilistic physiologically based pharmacokinetic model for penicillin G in milk from dairy cows following intramammary or intramuscular administrations. *Toxicol Sci.* 164(1):85–100.

Lopez-Benavides MG, Williamson JH, Pullinger GD, Lacy-Hulbert SJ, Cursons RT, Leigh JA. 2007. Field observations on the variation of *streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J Dairy Sci.* 90(12):5558–5566.

Machado A, Gales A. 2008. Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. [acedido em 2020 fevereiro 19]. http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/objetivos.htm.

Makovec JA, Ruegg PL. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 Samples (1994-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 222(11):1582–1589.

McDougall S, Arthur DG, Bryan MA, Vermunt JJ, Weir AM. 2007. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *N Z Vet J.* 55(4):161–170.

McDougall S, Hussein H, Petrovski K. 2014. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *N Z Vet J.* 62(2):68–76.

McDougall S, Parkinson TJ, Leyland M, Anniss FM, Fenwick SG. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J Dairy Sci.* 87(7):2062–2072.

Milne MH, Biggs AM, Barrett DC, Young FJ, Doherty S, Innocent GT, Fitzpatrick JL. 2005. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. *Vet Rec.* 157(9):245–250.

Odierno L, Calvino L, Traversa P, Lasagno M, Bogni C, Reinoso E. 2006. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *J Dairy Sci.* 89(10):3886–3890.

Paduch JH, Mohr E, Krömker V. 2013. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J Dairy Res.* 80(2):159–164.

Patel D, Almeida RA, Dunlap JR, Oliver SP. 2009. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 137(3–4):297–301.

Pitkälä A, Koort J, Björkroth J. 2008. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J Dairy Sci.* 91(10):4075–4081.

Plumb DC. 2011. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 7^a edição. Wisconsin (WI): PharmaVet Inc.

Pullinger GD, López-Benavides M, Coffey TJ, Williamson JH, Cursons RT, Summers E, Lacy-Hulbert J, Maiden MC, Leigh JA. 2006. Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing: Analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 72(2):1429–1436.

Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res.* 34(5):565–578.

Pyörälä S. 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Ir Vet J.* 62(4):40–44.

Rato MG, Bexiga R, Nunes SF, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. 2008. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci.* 91(12):4542–4551.

Riekerink RGMO, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 91(4):1366–1377.

Riviere JE, Papich MG. 2018. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 10^a edição. Iowa (IA): Wiley Blackwell.

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

Rossi RS, Amarante AF, Guerra ST, Latosinski GS, Rossi BF, Rall VLM, de Figueiredo Pantoja JC. 2019. Efficacy of cefquinome and a combination of cloxacillin and ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis. *PLoS One*. 14(4):1–16.

Roth Z, Wolfenson D. 2016. Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Domest Anim Endocrinol*. 56:S218–S227.

Ruegg PL. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 19(1):47–73.

Ruegg PL. 2018. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 34(3):413–425.

Samson O, Gaudout N, Schmitt E, Schukken YH, Zadoks R. 2016. Use of on-farm data to guide treatment and control mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci*. 99(9):7690–7699.

Sandgren CH, Waller KP, Emanuelson U. 2008. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Vet J*. 175(1):108–117.

Santos EMP dos, Brito MAVP, Lange C, Brito JRF, Cerqueira MMOP. 2007. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Sci Vet*. 35(1):17.

Segura M, Gottschalk M. 2004. Extracellular virulence factors of *Streptococci* associated with animal diseases. *Front Biosci* 9:1157–1188.

Sérieys F, Raguet Y, Goby L, Schmidt H, Friton G. 2005. Comparative efficacy of local and systemic antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastitis. *J Dairy Sci*. 88(1):93–99.

Sharif A, Muhammad G. 2008. Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: a review. *Vet J*. 28(4):194–200.

Shome BR, Bhuvana M, Mitra S Das, Krithiga N, Shome R, Velu D, Banerjee A, Barbuddhe SB, Prabhudas K, Rahman H. 2012. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Trop Anim Health Prod*. 44(8):1981–1992.

Smith BP. 2015. *Large Animal Internal Medicine*, 5ª edição. Missouri (MO): Elsevier. Capítulo 36, Mammary Gland Health; p. 1015–1039.

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

Steenefeld W, Swinkels J, Hogeveen H. 2007. Stochastic modelling to assess economic effects of treatment of chronic subclinical mastitis caused by *Streptococcus uberis*.

Taponen S, Dredge K, Henriksson B, Pyyhtiä AM, Suojala L, Junni R, Heinonen K, Pyörälä S. 2003. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria - A double blind field study. *J Vet Pharmacol Ther.* 26(3):193–198.

Thomas V, De Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, Marion H, Vallé M. 2015. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents.* 46(1):13–20.

United States Pharmacopeia. 2003. Penicillin g veterinary intramammary local. [acedido em 2020 março 14]. <https://cdn.ymaws.com/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/penicillinG-in.pdf>

United States Pharmacopeia. 2007. Aminopenicillins veterinary systemic. [acedido em 2020 março 14]. <https://cdn.ymaws.com/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/aminopenicillins.pdf>

Varhimo E, Varmanen P, Fallarero A, Skogman M, Pyörälä S, Iivanainen A, Sukura A, Vuorela P, Savijoki K. 2011. Alpha- and β -casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. *Vet Microbiol.* 149(3–4):381–389.

Wente N, Klocke D, Paduch J-H, Zhang Y, Seeth M tho, Zoche-Golob V, Reinecke F, Mohr E, Krömker V. 2019. Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci.* 102(10):9360–9369.

Wilkinson A. 2003. To seal or not to seal: internal teat sealant strategies. National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings.

Williamson JH, Woolford MW, Day AM. 1995. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *N Z Vet J.* 43(6):228–234.

Woolford MW, Williamson JH, Henderson H V. 1998. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. *J Dairy Res.* 65(2):187–198.

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci.* 84(3):590–599.

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT, Schukken YH. 2001. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 84(12):2649–2663.

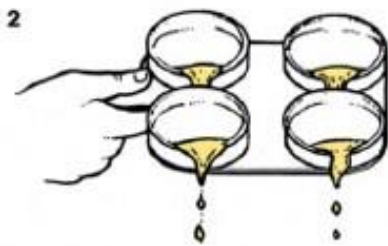
Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol Infect.* 130(2):335–49.

11. Anexos

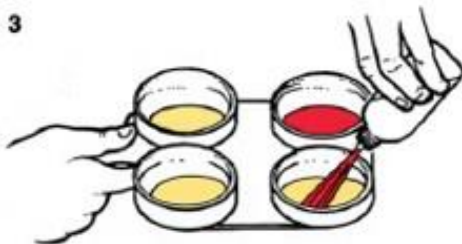
Anexo 1 - Esquema figurativo da metodologia do TCM (Adaptado de Blowey and Edmondson 2010)



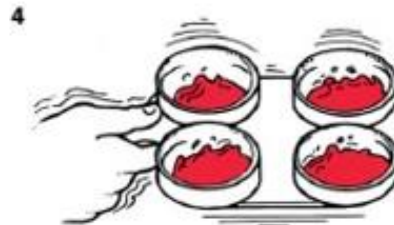
Recolha de um pequeno volume de leite para a zona correspondente a cada teto da placa de teste.



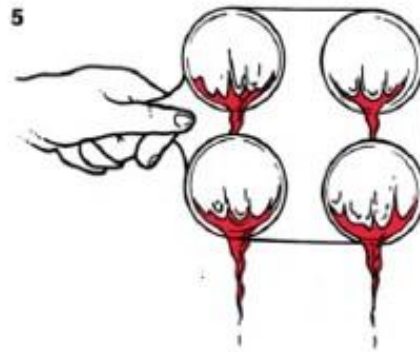
Descarte do leite recolhido em excesso.



Adição, de um volume equivalente ao do leite, de reagente.



Homogeneização da mistura.



Examinação das soluções: deteção de formação de precipitado ou gel.

Anexo 2 - Relatório emitido pelo sistema Vitek 2 Gram Positivo após identificação do agente

Proleite

Cliente bioMérieux: Relatório do Laboratório
 N° do Sistema: Impresso a 6/Fev/2020 14:01 GMT
Impresso por: salete

Nome do Doente: ██████████ ID do Doente: 9740
 Grupo de Isolados: n.12 - 3/2 GP-1

Tipo de carta: GP Aparelho de teste: 000014EEDDE6 (10475)

Bionúmero: 171054765353471

Quantificação de microrganismos:

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta: GP	N° de Lote: 2421219403	Data de Validade: 29/Mar/2021 13:00 BST
	Concluído: 5/Fev/2020 22:01 GMT	Estado: Final	Hora da Análise: 4,75 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade Streptococcus uberis		Bionúmero: 171054765353471
Microrganismo FRS		Confiança:	Excelente identificação
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:			
Mensagens da Análise:			
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)			

Detalhes Bioquímicos																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	+	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	+	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	+
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	dSOR	+	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	-
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 07.01
 Norma de Interpretação CMI:
 Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
 Último Parâmetro AES Modificado:

Página 1 de 1

Anexo 3 – Tabelas de contingência de base dos vários testes estatísticos elaborados (teste exato de Fisher).

		Resposta Terapêutica		Total
		Cura	Falha	
Protocolo Terapêutico	5 dias	1	3	4
	5 dias + IM	4	3	7
	7 dias	6	5	11
Total		11	11	22

		Resposta Terapêutica		Total
		Cura	Falha	
Paridade	Primípara	3	0	3
	Múltipara	8	11	19
Total		11	11	22

		Resposta Terapêutica		Total
		Cura	Falha	
Fase de Lactação	< 75 DEL	2	5	7
	76-225 DEL	3	2	5
	>225 DEL	6	4	10
Total		11	11	22

		Resposta Terapêutica		Total
		Cura	Falha	
Duração da Infecção (meses)	0	6	2	8
	1	1	2	3
	2	0	3	3
	3	1	0	1
	4	3	4	7
Total		11	11	22

		Resposta Terapêutica		Total
		Cura	Falha	
Tempo de Atraso	< 7 dias	5	1	6
	7-14 dias	2	3	5
	15-21 dias	3	1	4
	> 21 dias	1	6	7
Total		11	11	22