

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ANÁLISE DO BENEFÍCIO CLÍNICO E ECONÓMICO DA CULTURA BACTERIANA
EM VACARIA NO APOIO AO TRATAMENTO DA MASTITE CLÍNICA

NATHALYA THAYS MARTINS VIEIRA DE CARVALHO

ORIENTADOR:
Doutor José Ricardo Dias
Bexiga

TUTOR:
Doutor Dário Alexandre
de Sá Guerreiro

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ANÁLISE DO BENEFÍCIO CLÍNICO E ECONÓMICO DA CULTURA BACTERIANA
EM VACARIA NO APOIO AO TRATAMENTO DA MASTITE CLÍNICA

NATHALYA THAYS MARTINS VIEIRA DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor George Thomas Stilwell

VOGAIS:

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR:

Doutor José Ricardo Dias
Bexiga

TUTOR:

Doutor Dário Alexandre
de Sá Guerreiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois tudo que sou e que tenho devo a Ele. Certamente que a Tua bondade me acompanhará todos os dias da minha vida.

Ao meu pai, que me transmitiu todos valores que formaram o meu caráter. Não poderia ter tido um pai melhor, obrigada. Tenho certeza de que aí de cima continuas a acompanhar a minha jornada.

A minha mãe e irmã, que sempre me acompanharam durante esta caminhada, agradeço pela imensa força transmitida ao longo de todos estes anos.

Ao meu namorado, pela imensa paciência e companheirismo ao longo destes anos, por conseguir me tirar um sorriso em meio a época de exames.

Ao professor Dr. Ricardo Bexiga por ser um exemplo de profissional para mim.

Obrigada por todo conhecimento transmitido, por toda atenção concedida, pela imensa paciência e compreensão nos mínimos detalhes para que esta tese fosse realizada.

Ao Dr. Dário Guerreiro com quem tive o prazer de estagiar, obrigada pela amizade desenvolvida, pelo bom humor matinal e acima de tudo, por todo conhecimento transmitido.

Ao Dr. André Parada com quem também tive o prazer de estagiar, agradeço por servir de inspiração, pela amizade, por todo ensinamento e claro, por todas as boleias.

As minhas colegas de estágio, Ana Filipa Picanço, Rita Gama, Marina Oliveira e Ana Bettencourt, pela amizade, companheirismo e pela ótima companhia. Foi um prazer aprender com vocês.

Um agradecimento especial as minhas amigas da faculdade, Cláudia Alvarado, Catarina Lima, Sara Silva e Soraia Lopes, obrigada por me terem recebido tão bem e pela força que transmitimos umas as outras durante todo o curso.

Aos meus amigos e familiares que de certa forma me acompanharam até aqui.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

ANÁLISE DO BENEFÍCIO CLÍNICO E ECONÓMICO DA CULTURA BACTERIANA EM VACARIA NO APOIO AO TRATAMENTO DA MASTITE CLÍNICA

A mastite clínica (MC) é uma das doenças mais prevalentes na exploração leiteira, sendo caracterizada por elevados custos e prejuízos para o produtor. A este prejuízo está associado principalmente a utilização de antibióticos, tanto pelo seu valor, quanto pelo descarte de leite proveniente da sua utilização. O objetivo deste estudo foi analisar o benefício clínico e económico da realização de culturas bacterianas no apoio à implementação de um tratamento seletivo nos casos de MC. O estudo foi realizado numa exploração leiteira localizada no Ribatejo, onde um total de 332 casos de MC no período de 2018/2019 contribuíram para a análise de dados. Após a realização da cultura realizada na exploração pelos tratadores, e a interpretação do seu resultado, os casos de MC foram distribuídos por dois grupos: tratamento com antibiótico e sem tratamento antibiótico. As amostras que levaram a multiplicação de agentes Gram-positivos determinaram o tratamento com antibióticos, e amostras com multiplicação de agentes Gram-negativos ou ausência de multiplicação, determinaram a ausência de tratamento antibiótico. Os casos tratados com antibiótico tiveram um custo médio de 146,03€/caso enquanto os casos do grupo sem tratamento tiveram um custo médio de 48,59€/caso. A realização da cultura bacteriana demonstrou que 68% dos casos de MC não eram elegíveis para utilização de antibiótico. Portanto, o produtor ao utilizar a cultura bacteriana na sua exploração pode se beneficiar economicamente ao reduzir em 60% o impacto global da doença na sua exploração. Além disso, não foram encontradas diferenças clínicas estatisticamente significativas nas taxas de cura e refugo entre os grupos tratados com antibiótico e sem tratamento.

Palavras-chave: mastite clínica, cultura bacteriana, tratamento seletivo, antibióticos.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE CLINICAL AND ECONOMIC BENEFIT OF BACTERIAL CULTURE IN COWS IN SUPPORTING THE TREATMENT OF CLINICAL MASTITIS

Clinical mastitis (CM) is one of the most prevalent diseases on the dairy farm and is characterized by high costs and losses for the farmer. This damage is mainly associated with the use of antibiotics, both for their value and for the disposal of milk from their use. The objective of this study was to analyze the clinical and economic benefit of using a bacterial culture system to support the implementation of selective treatment in CM cases. The study was conducted at a dairy farm located in Ribatejo, where a total of 332 cases of CM in the period 2018/2019 contributed to the data analysis. After culture and interpretation of the results, the CM cases were distributed in two groups: antibiotic treatment and no antibiotic treatment. The samples that led to the growth of Gram-positive agents determined the treatment with AB, and samples with growth of Gram-negative agents or no growth, determined the absence of antibiotic treatment. Cases treated with antibiotics had a mean cost of 146.03€/case while cases in the untreated group had a mean cost of 48.59€/case. Bacterial culture demonstrated that 68% of CM cases were not eligible for antibiotic use. Therefore, the producer by using the bacterial culture on his farm could benefit economically by reducing the overall impact of the disease on his farm by 60%. Furthermore, no statistically significant clinical differences were found in cure and cull rates between antibiotic treated and no antibiotic treatment groups.

Keywords: clinical mastitis, bacterial culture, selective treatment, antibiotics.

ÍNDICE GERAL

1. RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A glândula mamária.....	2
2.2 Defesa da glândula mamária	2
2.3 Lactogénese	3
2.4 Introdução a Mastite	3
2.5 Definição e classificação	4
2.5.1 Mastite Clínica.....	5
2.5.2 Mastite Subclínica	5
2.6 Etiologia	5
2.7 Diagnóstico.....	6
2.7.1 Diagnóstico de mastite clínica	6
2.7.2 Diagnóstico de mastite subclínica	7
2.7.3 Contagem de células somáticas.....	7
2.7.4 Teste californiano de mastite	8
2.8 Tratamento e Controle	10
2.9 Impacto econômico	10
2.10 Custos indiretos e diretos	11
2.10.1 Custo de tratamento e diagnóstico.....	12
2.10.2 Leite de descarte.....	12
2.10.3 Aumento da mão-de-obra.....	12
2.10.4 Diminuição da produção de leite	13
2.10.5 Aumento da taxa de refugo e morte.....	13
2.10.6 Aumento do risco de transmissão dentro do efetivo.....	14
2.11 Utilização de antibióticos na mastite	14
2.12 Utilização de cultura bacteriana para implementação de protocolos de tratamento e seus benefícios	15
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Descrição da Exploração	19
4.2 Recolha de informação	20
4.3 Realização da cultura bacteriana e definição dos grupos	20
4.4 Definição das variáveis utilizadas	22
4.5 Método de tratamento da exploração	23
4.6 Análise Estatística	27
5. RESULTADOS.....	28

5.1 Proporção de cura entre grupos.....	28
5.2 Proporção de refugo entre grupos	29
5.3 Proporção de recorrência entre grupos	30
5.4 Leite descartado e custo total entre grupos	30
5.5 Leite descartado e custo total entre tipos de protocolos no grupo tratado	31
5.6 Cálculo dos custos envolvidos.....	24
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO.....	36
8. BIBLIOGRAFIA.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Escala clínica para determinar a gravidade da mastite (Adaptado de Scott et al. 2011)	4
Tabela 2. Fatores individuais que influenciam a CCS nas amostras de leite (Adaptado de Constable et al. 2016)	8
Tabela 3. Reações de teste californiano de mastite e contagem de células somáticas equivalentes e pontuação de células somáticas no leite bovino (adaptado de Constable et al. 2016).....	9
Tabela 4. Contribuição de cada fator para o impacto económico total da doença (%) (Adaptado de Serrenho 2015).....	11
Tabela 5. Teste de qui-quadrado para variáveis tratamento e ocorrência de cura....	29
Tabela 6. Teste de qui-quadrado para variável tratamento e ocorrência de refugo ..	29
Tabela 7. Teste de qui-quadrado para variável tratamento e recorrência.....	30
Tabela 8. Teste de comparação entre os dois grupos	30
Tabela 9. Teste de comparação entre os dois tipos de protocolo	31
Tabela 10. Indicadores envolvidos no custo da mastite e seus respectivos custos	24
Tabela 11. Custo médio da mastite tratada com antibiótico (AB).....	25
Tabela 12. Custo médio da mastite sem tratamento (ST).....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Realização do Teste Californiano de Mastite (TCM) (Imagem adaptada de Scott et al. 2011)	9
Figura 2. Etapas do programa de cultura na exploração para amostras de mastite clínica	21
Figura 3. Placa Vetorapid com 3 compartimentos para identificação bacteriana	22
Figura 4. Protocolos (1 e 2) de tratamento de mastite clínica realizados na exploração.....	23
Figura 5. Gráfico da contribuição de cada indicador (%) envolvido no custo médio da mastite sem tratamento	26
Figura 6. Gráfico da contribuição de cada indicador (%) envolvido no custo médio da mastite tratada com antibiótico.....	26
Figura 7. Gráfico de distribuição dos animais pelos grupos	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	antibiótico
AINE	anti-inflamatório não esteroide
BST	somatotropina bovina
CCS	contagem de células somáticas
Dp	desvio padrão
e.g.	por exemplo
etc.	et cetera
Máx	máxima
MC	mastite clínica
Min	mínimo
mL	mililitro
MSC	mastite subclínica
N	amostra
PIB	produto interno bruto
ST	sem tratamento
TCM	teste californiano de mastite
vs	versus
%	percentagem
®	marca registrada

1. RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular foi iniciado no dia 12 de setembro de 2019 e teve seu fim a 13 de dezembro de 2019, correspondendo a 500 horas. Foi realizado na região de Península de Setúbal e Baixo Alentejo, sob orientação do Dr. Dário Guerreiro. O estágio foi maioritariamente voltado para a clínica de bovinos de carne e leite, e numa menor parte, pequenos ruminantes. Além disso, apesar de uma quantidade muito inferior de casos, a autoria também teve a oportunidade de acompanhar clínica de cavalos, suínos, camelos, cães e gatos.

Durante o período de estágio, a autora acompanhou o Dr. Dário Guerreiro e seu colega de trabalho, o Dr. André Parada. Com estes, tive a oportunidade de realizar diversas atividades em diferentes áreas, tais como:

- Clínica de espécies pecuárias: diagnóstico e tratamento de pneumonias, retenções placentárias, timpanismo, diarreias neonatais, prolapso uterino, queratoconjuntivite infecciosa bovina, metrite, mastites, cetoses, acidoses, patologias podais, entre outros;
- Reprodução em bovinos de leite e carne: diagnósticos de gestação, partos, manobras obstétricas, palpações retais e ultrassonografia para diagnóstico de gestação e avaliação de involução uterina, metrites pós-parto;
- Cirurgia em ruminantes: cesariana, castração de carneiros, deslocamento do abomaso à esquerda, deslocamento do abomaso à direita, hérnia umbilical;
- Necropsia de ruminantes;
- Saneamento em bovinos: prova de tuberculinização (pré-movimentação), recolha de sangue para despiste de brucelose bovina e leucose enzoótica bovina;
- Saneamento em camelos: prova de tuberculinização;
- Vacinação e desparasitação de bovinos, ovinos, caprinos, equinos, canídeos e felídeos;
- Colocação de marcas auriculares em vitelos;
- Colocação de identificação eletrónica em canídeos e felinos;
- Eutanásia de canídeos.

No decorrer dessas atividades tive a oportunidade de desenvolver componentes práticas como execução de diagnóstico, realização de exames complementares, cálculo de doses, administração de fluidoterapia, administração medicamentos por via oral, subcutânea, intramuscular, endovenosa e intrauterina. Observar e colaborar em práticas cirúrgicas e necropsias, recolha de sangue. Além disso, também foi possível colaborar com manuseamento e identificação dos animais e preenchimento de fichas técnicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A glândula mamária

A glândula mamária compreende a modificação de glândulas sudoríparas produtoras de leite (Frandsen et al. 2009). O seu desenvolvimento ocorre no início da vida fetal através do espessamento bilateral do ectoderma ventrolateral do embrião (cristas mamárias). Nas vacas desenvolvem-se quatro glândulas mamárias inguinais, formando assim o úbere (Frandsen et al. 2009).

O úbere da vaca é formado por quatro glândulas individuais, cada uma com um teto, conhecidas como quartos, o qual é dividido em duas metades, direita e esquerda, formando o quarto cranial (frontal) e um caudal (traseiro). Os quartos trabalham de forma independentes, uma vez que o suprimento sanguíneo, suprimento nervoso e aparelho suspensor ocorrem de forma individual (Frandsen et al. 2009).

O teto, constituinte do úbere, possui como principal função a alimentação do bezerro jovem e a nível da produção este permite que através da sua ordenha manual, ou mecânica, se obtenha leite. Aqui, a musculatura do seu esfíncter ao realizar a contração, mantendo-o fechado entre ordenhas exerce um papel importante ao impedir a entrada de agentes patogénicos no interior da glândula mamária. Além do mais, o teto sendo revestido por queratina com propriedades bactericidas, tem papel importante na prevenção da entrada de agentes infecciosos no úbere, constituindo assim uma barreira de defesa do organismo (Blowey e Edmondson 2010; Quinn et al. 2011).

2.2 Defesa da glândula mamária

Após a entrada de um agente patogénico na glândula mamária, o úbere desencadeia diversos mecanismos de defesa contra esse agente a fim de cessar a inflamação, denominada de mastite. A resposta positiva a esses mecanismos é imprevisível, dado que se trata de uma resposta individual dos animais (Blowey e Edmondson 2010).

O teto e a pele constituem um mecanismo primário de defesa do úbere contra o ambiente externo (Andrews et al. 2008a). A presença de células queratinizadas, presentes no canal do teto, e a sua descamação contribui para remoção mecânica de bactérias no local.

Além do mais, a presença dos ácidos gordos na camada queratinizada, exerce um efeito bacteriostático em relação a esses agentes (Quinn et al. 2011). Não obstante, a integridade da pele juntamente com higiene da mesma, é um mecanismo de defesa fundamental, uma vez que pode ocorrer colonização bacteriana em cortes, fissuras, verrugas e todo o tipo de feridas podendo levar a um quadro de mastite (Blowey e Edmondson 2010).

Uma vez ultrapassada a primeira linha de defesa, o próximo mecanismo contra os agentes patogénicos é chamado de defesa intrínseca (Blowey e Edmondson 2010). Aqui, os neutrófilos exercem um papel crítico no desenvolvimento da doença (Smith 2008).

Por último, a imunidade humoral, como as imunoglobulinas (Ig), desempenham um papel importante na defesa da glândula mamária ao estimular a produção de Ig local, aumentando assim a fagocitose que promove a eliminação dos organismos patogénicos (Andrews et al. 2008a; Smith 2008).

2.3 Lactogénese

Devido à pressão da produção de leite, o úbere da vaca passou por adaptações anatómicas a fim de comportar expressivas quantidades de litros de leite. O sistema de suspensão do úbere é a adaptação mais relevante, formado pelo ligamento suspensor mediano, localizado entre os pares das glândulas mamárias, e pelos tendões da parede abdominal. Devido a esse sistema de suspensão uma vaca é capaz de ter 25 kg ou mais de leite no úbere antes da ordenha, caso contrário seu úbere não suportaria tamanho peso exercido sobre ele (Smith 2008; Cunningham 2012).

O parênquima da glândula mamária em lactação consiste em tecido secretor e nos ductos glandulares. O alvéolo é a principal estrutura secretora de leite. Ao seu redor estão células musculares, responsáveis pela libertação do leite dos alvéolos para os ductos, aquando do estímulo para libertação do mesmo. No que diz respeito a ejeção de leite, o teto por ser ricamente innervado, através do mecanismo de sucção, transmite rapidamente informação ao cérebro. Aqui a ocitocina exerce ação sobre as células mioepiteliais em volta dos alvéolos, induzindo assim uma boa descarga de leite (Blowey e Edmondson 2010).

A interação da hormona tireóidea e a hormona do crescimento, conhecida como somatotropina bovina (BST), são responsáveis pela secreção contínua de leite. Devido a relação direta da BST com a produção de leite, é possível através da sua dosagem relacionar o índice da produtividade leiteira, isto é, as vacas com produção mais altas possuem maior índice de BST circulante (Blowey e Edmondson 2010; Cunningham 2012).

2.4 Introdução a Mastite

Além de ser a doença mais frequente na exploração leiteira (Quinn et al. 2011), a mastite é uma das doenças com mais impacto económico nessas explorações em todo o mundo (Andrews et al. 2008a; Smith 2008; Fonseca 2015; Acosta et al. 2016; Peek e Divers 2018). É uma doença multifatorial, de uma larga complexidade (Peek e Divers 2018). A reação inflamatória pode estar associada a trauma físico, mecânico, químico, térmico ou agentes patogénicos como bactérias, vírus, fungos e algas, levando todos esses possíveis fatores ao

surgimento de uma reação inflamatória ao nível da glândula mamária, denominada mastite (Andrews et al. 2008a; Smith 2008; Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; FAO 2014; Fonseca 2015; Peek e Divers 2018). De acordo com Miranda et al. (2019), os principais agentes (>90%) envolvidos na mastite são as bactérias pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e alguns géneros Gram-negativos, como a *Escherichia coli* e a *Klebsiella* spp.

No ponto de vista económico, é considerada uma das doenças que geram mais perdas económicas ao produtor (Andrews et al. 2008a), sendo o prejuízo superior a \$1 bilhão em todo o mundo (Smith 2008).

2.5 Definição e classificação

Conforme mencionado anteriormente, a mastite é definida como a inflamação da glândula mamária que ocorre quando um ou mais agente patogénico ultrapassa as barreiras de defesa, desencadeando uma resposta inflamatória (Smith 2008). A manifestação de sinais clínicos ou ausência deles, permite classificar a mastite em clínica (MC) ou subclínica (MSC), respetivamente (Smith 2008; Scott et al. 2011).

Os casos clínicos de mastite variam quanto ao grau de acordo com os sinais clínicos presentes (Tabela 1). Podendo apresentar apenas alteração no leite (Grau I), leite alterado e úbere inflamado (Grau II) e por último, as alterações que não se restringem apenas ao leite e úbere, nomeadamente alterações sistémicas incluindo febre, apatia (Grau III) (Rodrigues 2008; Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011).

Essa classificação é importante, uma vez que os leites de vacas com mamites de grau I e II poderão ser avaliada por cultura bacteriana antes de se iniciar o tratamento com antibióticos e em contrapartida mamites grau III tem indicação para antibioterapia imediata.

Tabela 1. Escala clínica para determinar a gravidade da mastite (Adaptado de Scott et al. 2011)

	Sem infeção	Subclínica	Clínica: Leve (Grau I)	Clínica: Moderada (Grau II)	Clínica: Severa (Grau III)
Vaca	Normal	Normal	Normal	Normal	+
Úbere	Normal	Normal	Normal	+	+
Leite	Normal	Normal	+	+	+
CCS ¹	Normal	+	+	+	+
Presença de bactérias	0	+	+	+	+
¹ contagem de células somáticas					

2.5.1 Mastite Clínica

Fazem parte da sintomatologia clínica da mastite clínica o edema, endurecimento da glândula mamária, presença de coágulo, rubor, hiperemia, dor, desconforto. Nos quadros agudos (Grau III) é possível a manifestação de sinais clínicos sistêmicos (Andrews et al. 2008a).

Apesar da incidência variar entre as explorações, de uma forma geral é estimado que 15-20% das vacas leiteira terão mastite durante o período de lactação (Smith 2008).

2.5.2 Mastite Subclínica

A mastite subclínica é a mais prevalente nas explorações. De acordo com a FAO (2014), a MSC é 15-40% mais prevalente que a MC. As principais alterações observadas são o aumento da contagem de células somáticas (CCS) no quarto acometido e diminuição da produção de leite (Andrews et al. 2008a; Smith 2008).

O curso da doença vai depender da resposta aos mecanismos de defesa (Scott et al. 2011), podendo assim a MSC pode evoluir para forma clínica ou não (Andrews et al. 2008a; Smith 2008).

2.6 Etiologia

Estão relatados na literatura diferentes tipos de agentes patogénicos causadores de mastite, que pode ter origem contagiosa ou ambiental (Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; Peek e Divers 2018).

As infeções por agentes ambientais (e.g.: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, algas como a *Prototheca zopfii*, leveduras e outros fungos) estão associadas principalmente às condições higiénicas e sanitárias da exploração (Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; Acosta et al. 2016), estando a infeção facilitada por uma imunidade do hospedeiro comprometida (Acosta et al. 2016). A entrada desses agentes no canal do teto ocorre principalmente durante as ordenhas e período seco, dependendo das condições do meio aonde a vaca se encontra (Blowey e Edmondson 2010; Acosta et al. 2016; Peek e Divers 2018).

Já os agentes contagiosos (e.g.: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis*) vivem e multiplicam-se no interior da glândula mamária, podendo no momento da ordenha haver contaminação cruzada através das tetinas, mão dos ordenhadores ou panos de limpeza contaminados (Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; Acosta et al. 2016).

É importante que se perceba a diferença entre estes agentes no que diz respeito às fontes de infecção, prevalência, sintomatologia clínica e a resposta aos antimicrobianos.

No que diz respeito ao tratamento dessa doença, conhecer o agente envolvido é um ponto chave extremamente importante. Como por exemplo, nas infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, a sua rápida identificação é essencial para o manejo do efetivo devido à sua fraca resposta aos tratamentos com antibióticos intramamários (Ferreira et al. 2018).

A prevalência dos agentes envolvidos na mastite pode variar entre explorações de diversas regiões, assim como entre países (Rodrigues, Ana Carolina 2008).

Diversos autores concluíram que atualmente, devido às medidas profiláticas e sanitárias implementadas nas vacarias, a prevalência de mastites causada por agentes patogénicos contagiosos diminuiu consideravelmente (Makovec and Ruegg 2003; Bradley et al. 2007).

No que diz respeito aos agentes patogénicos ambientais, *E. coli* e *Streptococcus uberis*, foram descritos como sendo os mais prevalentes, estando presentes em 19,8% e 23,6% das amostras de cultura bacteriana, respetivamente (Makovec and Ruegg 2003).

Num trabalho mais recente realizado por Bradley et. al (2007), onde foi realizado um levantamento da etiologia da mastite clínica em 97 explorações leiteiras no Reino Unido, demonstrou que *Streptococcus uberis* foi o agente patogénico mais frequentemente isolado (23.5%), seguido *E. coli* (19.8%), *Staphylococcus coagulase-positivo* (4.6%), *Staphylococcus aureus* (3.3%). O resultado mais prevalente foi 'sem crescimento', representando 26.5% dos resultados.

Assim, sabe-se que 25% a 30% das amostras de mastite não tem crescimento (Makovec e Ruegg 2003; Bradley et al. 2007), portanto não necessitam da utilização de antibióticos (Lago et al. 2011a)

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Diagnóstico de mastite clínica

O diagnóstico inicia-se no exame físico de rotina através do exame da glândula mamária e sua secreção (Andrews et al. 2008; Constable et al. 2016). As observações de alterações físicas e/ou comportamentais são resultado de uma resposta inflamatória ao agente patogénico. Assim sendo, tanto o agente patogénico envolvido, como a resposta imunitária do hospedeiro, influenciam na resposta inflamatória e consequentemente a manifestação de sinais clínicos (Smith 2014).

2.7.2 Diagnóstico de mastite subclínica

É de extrema importância o diagnóstico da MSC no efetivo leiteiro uma vez que a sua prevalência tem relação direta com a diminuição da produção de leite. Além disso, as vacas infetadas e não diagnosticadas são reservatórios importantes da doença podendo propaga-la às vacas saudáveis (Smith 2014).

Como já referido, a MSC não apresenta sinais clínicos, o que torna o seu diagnóstico mais desafiador (Peek e Divers 2018). Um dos maiores indicativos de MSC é a alta CCS apesar de aparentemente a amostra de leite da vaca afetada estar normal (Nunes et al. 2008; Gómez-Quispe et al. 2015; Constable et al. 2016). No campo, devido ao seu baixo custo e por ser um teste rápido, o teste californiano de mastites (TCM) é o principal método para diagnosticar a MSC (Constable et al. 2016), podendo ser utilizado também a contagem individual de células somáticas (Cannas da Silva et al. 2018).

2.7.3 Contagem de células somáticas

As células somáticas incluem os leucócitos (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) e células epiteliais de descamação das glândulas mamárias. Devido ao mecanismo de resposta inflamatória, estima-se que num quadro de mastite há um aumento da secreção de neutrófilos na glândula mamária de até 95% (Peek e Divers 2018) e por isso há um aumento bastante característicos na CCS (Scott et al. 2011; Cunningham 2012; Hand et al. 2012).

A CCS tem sido usada desde há muitos anos como o principal método direto para deteção das mastites (Andrews et al. 2008; Scott et al. 2011; Smith 2014; Coutinho 2014). Pode ser feita individualmente ou em grupo. Individualmente permite monitorizar a evolução da doença, orientar as opções de tratamento ou tomada de decisões de refugo. Quando utilizado em grupo é feita no tanque de leite, dando uma perspetiva geral da distribuição da doença em todo grupo. É a técnica mais utilizada na monitorização da mastite nas explorações (Peek and Divers 2018).

Apesar do aumento da CCS poder ser influenciado por diversos fatores (Tabela 2), vários autores referem que uma contagem $>200.000\text{cél./ml}$ é indicativo de mastite (Smith 2008; Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; Smith 2014; Acosta et al. 2016; Peek e Divers 2018).

Tabela 2. Fatores individuais que influenciam a CCS nas amostras de leite (Adaptado de Constable et al. 2016)

Fator	Efeito	Comentário
Infeção bacteriana	Aumento	Os principais patogênicos causam um aumento da CCS em >200.000cél./ml Outros agentes patogênicos causam um modesto aumento da CCS, aproximadamente 50.000cél./ml
Mais de um quarto afetado	Aumento	Ocorre menos diluição por quartos não afetados
Número de lactações	Aumento	Muitas vezes, mas não exclusivamente, devido a uma maior probabilidade de infecção com a idade.
Fase da lactação	Variável	Aumenta nas duas semanas pós-parto, diminui no segundo mês da lactação e depois a aumenta gradualmente nos restantes meses da lactação. O aumento gradual na próxima lactação é mais acentuado em caso de infecção presente
Época do ano	Variável	As razões ainda não são claras, mas é reportado que durante a primavera e o verão é comum o aumento
Variação diurna	Relacionado com a hora da ordenha	Mais alta imediatamente após a primeira ordenha do dia e mais baixo na próxima ordenha
Dias em leite	Variável	É provável que exista uma pequena flutuação na CCS dia após dia
Variação entre vacas	Depende da vaca	Existe uma variação individual entre as vacas que está associada a diferenças fisiológicas e genéticas
Intervalo entre ordenhas	Variável	CCS tende a ser alta se a ordenha é realizada em intervalos curtos
Nutrição/toxinas	Variável	A presença de toxinas fúngicas pode resultar no aumento da CCS
Outras doenças sistêmicas	Variável	Doenças sistêmicas (p.e leptospirose) pode resultar em aumento da CCS
Contagem de células somáticas no tanque de leite	Variável	Se há um aumento na contagem no tanque de leite, a CCS individual aumenta, e vice-versa
Stresse fisiológico	Possível aumento	Alguns eventos stressantes (movimentação, doença sistêmica) podem causar aumento da CCS mesmo na ausência de mastite
Armazenamento	Variável	Métodos de armazenamento, preservação e transporte pode causar variação na CCS
Erros de contagem	Variável	Erros associados com o manuseamento da amostra no laboratório e a calibração da máquina de contagem automática podem causar variação na CCS

2.7.4 Teste californiano de mastite

O Teste Californiano de Mastite (TCM) é um teste indireto fundamentado na estimativa de DNA presente no leite. É conhecido também como teste rápido de mastite. Além da vantagem de ser um teste rápido, tem também baixo custo e pode ser feito no momento da ordenha (Andrews et al. 2008; Smith 2008; Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011; Smith 2014). Como desvantagem, é descrito o tacho de amostra só apresenta alterações em contagem superiores a 400.000 cél./ml (Blowey e Edmondson 2010; Scott et al. 2011).

A realização do TCM (Figura 1) é feita através da recolha de amostras de leite dos quartos individuais às quais é adicionado um reagente, um detergente e um indicador de pH. O contato desse reagente com as células nucleadas do leite, leva à lise das mesmas, e à exposição do material nuclear e uma vez que esse reagente contacta com o DNA leva a gelificação da amostra. A amostra ganha um aspecto viscoso (Andrews et al. 2008b; Smith 2008; Peek e Divers 2018). O grau de viscosidade da amostra define a classificação do TCM, e sabe-se que há uma relação direta entre a viscosidade e o número de leucócitos presentes na amostra (Tabela 3).

Tabela 3. Reações de teste californiano de mastite e contagem de células somáticas equivalentes e pontuação de células somáticas no leite bovino (adaptado de Constable et al. 2016)

Resultado do Teste	Reação observada	Equivalente CCS no leite	Equivalente SCS
Negativo	A mistura permanece líquida, sem espessamento ou formação de gel	0-200.000 cél./mL	0-4
Linear	Ligeira formação de gel que é mais perceptível quando a raquete é balançada de um lado para o outro	150.000-500.000 cél./mL	5
1+	Formação de gel ocorre imediatamente após a mistura e vai se desfazendo com o tempo.	400.000-1.500.000 cél./mL	6
2+	Formação de gel ocorre imediatamente após a mistura. Quando a raquete é agitada, o fluido forma uma massa periférica e o fundo da raquete é exposto.	800.000-5.000.000 cél./mL	7-8
3+	Formação de gel ocorre imediatamente após a mistura. Quando a raquete é agitada, a superfície da solução torna-se convexa.	>5.000.000 cél./mL	9

CCS, contagem células somáticas; SCS, linear score células somáticas



Figura 1. Realização do Teste Californiano de Mastite (TCM) (Imagem adaptada de Scott et al. 2011)

2.8 Tratamento e Controle

Em 1960 foi desenvolvido um “plano de controle da mastite”, cujo objetivo é reduzir a incidência da mastite e a diminuição da CCS no leite. Este plano engloba 5 pontos: manutenção das salas de ordenha, desinfecção dos tetos após a ordenha, tratamento e registo dos casos clínicos, refugo de animais com mastites crônicas e antibioterapia de secagem (Bexiga et al. 2005; Blowey e Edmondson 2010; Smith 2014).

Devido à sua alta incidência, a mastite continua sendo a doença mais responsável por perdas económicas nas explorações, tanto pelas perdas diretas e indiretas (abordado mais à frente) quanto pelo tratamento farmacológico, pelos programas de controlo e prevenção da doença (Nielsen 2009; Simões e Oliveira 2012; Hogeveen, Henk et al. 2014). Além disso, é a doença em explorações leiteiras na qual a utilização de antibióticos é mais frequente (Huijps et al. 2008).

A excessiva utilização de antibióticos tem despertado uma necessidade de controlar o seu uso, tanto por aspetos económicos quer pela disseminação de resistências aos antibióticos, que é um problema de saúde pública cada vez mais frequente e difuso (Keefe et al. 2011; FAO 2014). Idealmente, o tratamento de mastite com recurso a antibióticos deveria ser unicamente utilizado quando o grupo de agentes patogénicos envolvidos fossem identificados e quando existissem evidências do benefício da utilização dos mesmos (Rodrigues, Ana Carolina 2008; Keefe et al. 2011).

É evidente a importância de um correto diagnóstico e identificação dos agentes patogénicos envolvido na doença, a fim de direcionar os protocolos de tratamento e melhorar o controlo da doença (Rodrigues, Ana Carolina 2008).

2.9 Impacto económico

Sendo a mastite uma doença endémica nas explorações leiteiras de todo o mundo, é consequentemente uma doença com impacto direto na produção de leite eficiente (Hogeveen et al. 2014).

O impacto económico associado a mastite é variável de exploração para exploração, isto é, tem de se ter em conta fatores como, a sua ocorrência, sinais clínicos, as medidas de controlo utilizadas, o sistema de produção e as condições do mercado. Estes fatores variam de acordo com o país ou região. Existe um consenso entre toda comunidade técnico-científica de que a mastite está associada a elevados prejuízos económicos em qualquer que seja a exploração (Fonseca 2015).

Um estudo realizado por Serrenho (2015) em três bacias leiteiras em Portugal, demonstrou que as mastites são responsáveis por perdas anuais médias de 147€/vaca/ano.

As explorações leiteiras são empresas em que um dos principais fatores que contribuem para os maus resultados é a redução da produção de leite (quantidade de leite não produzida devido à doença e quantidade de leite descartado devido a resíduos de antibióticos), com as características aceitáveis e desejáveis para a sua colocação no mercado, redução essa que pode persistir durante um período variável (Hogeveen et al. 2011; Serrenho 2015). Uma vez que afeta a qualidade técnica e higiénica do leite, a mastite torna-se uma preocupação para a indústria de laticínios (Hogeveen et al. 2014).

Além disso, estão regulamentadas penalizações ou bonificações pela qualidade do leite produzido, qualidade essa definida por alguns indicadores, os quais possuem valores limites tabelados como referência. Sabe-se que os valores da CCS e TCM aumentam no curso da doença, e por isso estão diretamente relacionados com a qualidade do leite. Além desses indicadores, a presença de resíduos de antibióticos deve ser ponderada, pois é considerada um fator para recusa do leite na fábrica, com a sua perda total. No mais, o teor butíroso, teor proteico e o índice crioscópico também possuem valores tabelados (Hogeveen et al. 2014; Serrenho 2015).

2.10 Custos indiretos e diretos

A mastite é uma das doença que mais custos acarreta aos produtores de leite (Down et al. 2017). Os custos associados às mastites podem ser divididos em duas categorias, custos diretos (custo do tratamento e diagnóstico, leite de descarte e aumento da mão-de-obra) e custos indiretos (diminuição da produção de leite, aumento da taxa refugo e morte, e aumento do risco de transmissão dentro do efetivo) (Fonseca 2015; Down et al. 2017). A tabela 4, ilustra a contribuição de cada indicador para o impacto económico total da doença (%).

Tabela 4. Contribuição de cada fator para o impacto económico total da doença (%) (Adaptado de Serrenho 2015)

Parâmetros	Referências bibliográficas	NMC (1998)	Huijps et al. (2008)
Perdas de produção		66	71
Custo de Reposição		22,6	16
Leite descartado		5,7	6,4
Tratamento		4,1	4,2
Serviços Veterinários		1,5	1
Mão-de-obra		0,1	2,3

2.10.1 Custo de tratamento e diagnóstico

Estão incluídos neste grupo os custos associados ao serviço veterinário e o valor dos medicamentos.

No que diz respeito aos custos associados ao serviço veterinário, este inclui principalmente os custos relativos ao controle e prevenção de doença. Sabe-se que este custo difere entre explorações de acordo com o programa de controlo de mastite praticado (Serrenho 2015).

Quanto ao custo com medicamentos, esses são de mais fácil cálculo, uma vez que os documentos de faturação e registos de tratamento constituem uma ferramenta de controlo. Resumidamente, nestes custos incluem-se os antibióticos intramamários e injetáveis, e também os anti-inflamatórios (Fonseca 2015; Serrenho 2015).

A redução da utilização excessiva de antibióticos, tema discutido mais a frente, é essencial não só no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência pelos microorganismos, mas também pelo impacto económico que está associado à utilização desse medicamento ao tratamento dessa doença.

Além destes custos, as culturas bacterianas devem ser consideradas entre os gastos associados a esta doença (Degen et al. 2015; Fonseca 2015; Serrenho 2015).

2.10.2 Leite de descarte

São considerados como leite de descarte leite de transição, o leite de animais com mastite e o leite de vacas tratadas com antibióticos (Fonseca 2015).

Para realizar o cálculo de leite descartado tem que se considerar os dias de tratamento e o intervalo de segurança do medicamento utilizado, período este em que o leite não é aproveitado para consumo humano (Serrenho 2015).

2.10.3 Aumento da mão-de-obra

Este custo é influenciado pelo protocolo de controlo adotado na exploração no manejo dessa doença.

A nível da biossegurança exigida no controlo da mastite, há um maior tempo despendido no manejo da vaca doente, e consequentemente uma diminuição da eficiência da realização de outras tarefas rotineiras. Neste ponto, deve ser considerado se o trabalho é realizado por um colaborador externo (assalariado) ou interno (familiar).

De uma maneira geral, a presença de mastite numa exploração requer maior atenção para a vaca doente, exigindo uma maior carga horária de trabalho e consequentemente aumento salarial (Fonseca 2015; Serrenho 2015).

2.10.4 Diminuição da produção de leite

As perdas associadas às diminuições da produção são extremamente variáveis, dependentes de vários fatores como, do agente causal, do nível de produção e da fase de lactação, assim como do número de parições (Fonseca 2015). Além disso, a mastite tanto pode afetar a lactação presente, quanto a produção a longo-prazo, isto é, nas lactações seguintes (Huijps et al. 2008; Hogeveen et al. 2014).

Devido a inúmeras variações e complexidades associados a essa perda, há muitas discrepâncias nos valores obtidos, sendo impossível aferir o custo exato associado a essa perda (Fonseca 2015).

2.10.5 Aumento da taxa de refugo e morte

Os animais com mastite são suscetíveis a refugo involuntário, quando o produtor é forçado a fazê-lo. Esse refugo pode ser visto como uma perda para o produtor, ou como uma medida preventiva, quando o refugo do animal infectado previne o surgimento da doença na mesma vaca e a transmissão de mastite entre as vacas no mesmo efetivo (Hogeveen et al. 2011).

Diretamente associado ao refugo está o custo de reposição. A compra ou a recria de um animal de substituição, uma novilha, implica custo direto, uma vez que o animal pode apresentar uma menor eficiência produtiva, tal como observado numa primípara face a uma múltipara, por exemplo (Serrenho 2015). Uma vez que esses custos incluem não só os do próprio animal, como custo de reposição, os custos associados ao refugo são reconhecidos como difíceis de calcular devido à sua complexidade (Hogeveen et al. 2011).

Apesar da taxa de mortalidade provocada pela mastite ser relativamente baixa, os casos severos de mastite podem levar à morte dos animais. Esta morte implica não só os custos associados à perda do valor de mercado da vaca, mas também o custo da lactação interrompida, e os custos associados à substituição do animal (Fonseca 2015).

2.10.6 Aumento do risco de transmissão dentro do efetivo

Os animais com mastite, excretam os microrganismos patogénicos de forma constante ou intermitente, sendo então considerados uma fonte de propagação da doença (Scott et al. 2011).

2.11 Utilização de antibióticos na mastite

Além de ser descrita como a doença com maior impacto económico nas explorações, é também a doença associada a uma maior utilização de antibióticos (Pol e Ruegg 2007; Blowey e Edmondson 2010).

A relação entre a utilização de antibióticos na criação de animais com fins produtivos e o desenvolvimento de resistência antimicrobiana vem sendo discutida, reforçando a necessidade de ser defendida a utilização prudente de antibióticos (Hogeveen et al. 2014).

Um estudo recente demonstrou que 43% dos casos de mastite têm precedentes. Isso enfatiza a importância da mastite recorrente como um desencadeador para o tratamento malsucedido com antibióticos. Dito isso, o uso desnecessário de antibióticos pode ser evitado pela remoção de animais com mastite incurável do rebanho. Ou seja, se a probabilidade de cura for baixa, o tratamento com esses medicamentos deve ser evitado (Degen et al. 2015).

Sabe-se que o uso excessivo de antibióticos é um problema a nível mundial (Brunton et al. 2012) e existe uma pressão crescente para reduzir a utilização destes medicamentos (Down et al. 2017). Essa excessiva utilização de antibióticos foi descrita por Brunton et al. (2012) através de um estudo realizado em 557 explorações no Reino Unido no período de 2010/2011. Foi demonstrado que 93% dessas explorações usaram antibióticos intramamários para tratar a mastite, e que 96% das explorações usaram antibióticos no período de secagem. Este mesmo estudo demonstrou que o leite de descarte produzido por vacas mamíferas tratadas com antibióticos, pode ser um dos principais motivos para o aparecimento de resistência bacteriana em vitelos alimentados com esses leites.

Face a isto, uma abordagem alternativa a fim de reduzir essa excessiva utilização, seria a implementação da realização de cultura bacterianas nas explorações, onde apenas os casos graves associados a multiplicação de bactérias de Gram-positivos ou de Gram-positivos e Gram-negativos simultaneamente são tratados com medicamentos antimicrobianos. Como resultado desta medida, muitos casos ligeiros ou sem multiplicação bacteriana não seriam tratados no todo com esses medicamentos (Lago et al. 2011a; Down et al. 2017).

2.12 Utilização de cultura bacteriana para implementação de protocolos de tratamento e seus benefícios

Para se compreender melhor esse tema é necessário definir o termo “cura”, os fatores que afetam a cura e a necessidade do tratamento com antibióticos.

A cura bacteriológica implica que os microorganismos detetados antes do tratamento não foram encontrados posteriormente. Existe também a cura citológica, que é verificada pela presença ou ausência de contagem de células somáticas elevada. A cura clínica é considerada quando a glândula mamária não apresenta sinais externos de inflamação e o leite tem um aspeto visualmente normal (Degen et al. 2015).

A administração de antibióticos só garante a cura bacteriológica, e na melhor hipótese, a cura bacteriológica é seguida da cura clínica e citológica. Portanto, é fundamental e crucial, avaliar a probabilidade de cura bacteriológica para tomada de decisões (Degen et al. 2015).

Sabe-se que a taxa de cura após o tratamento com antibióticos é influenciada não só pelos fatores da vaca (paridade, idade, fase da lactação, CCS, histórico de mastite recorrente, etc.) como também pelas características intrínsecas do agente patogénico causal. Por conseguinte, o tratamento específico da mastite é frequentemente recomendado (Hogeveen et al. 2014).

No entanto, apesar de não poder ser considerada de forma isolada, a CCS por ser de fácil obtenção e realizada rotineiramente nas explorações leiteiras, poderá ser utilizada como indicador da probabilidade de cura bacteriológica, como tem sido demonstrado em diversos estudos. Isto é, quanto mais alta a CCS e quanto mais tempo persistir, menor a probabilidade de cura (Degen et al. 2015).

No mais, o tratamento da mastite deve ser o mais assertivo possível, isso porque o tratamento ineficaz de mastite clínica pode resultar em mastite crónica. Além disso, os casos de infeções agudas e graves resultam em danos permanentes dos tecidos no úbere, impedindo o funcionamento eficaz da glândula mamária. Um quarto incorretamente tratado tem maior probabilidade de recidivar (Degen et al. 2015).

Portanto, sendo a mastite uma doença prevalente nas explorações, a qual acarreta muitos prejuízos a nível económico, assim como a utilização muitas vezes indevida de antibióticos, é evidente a necessidade de tornar o tratamento o mais assertivo possível. Por isso muitas explorações vêm adotando a realização de culturas bacterianas para identificação do agente envolvido em casos de mastite como um adjuvante ao tratamento dessa doença (Rodrigues, 2008; Smith 2008; Keefe et al. 2011). A realização de cultura bacteriana nas explorações leiteiras por parte dos produtores visa prioritariamente o controlo da mastite ponderando os custos do controlo e tratamento vs a redução de perdas devido a esse controle, ou seja, a otimização económica da sua empresa (Hogeveen et al. 2014).

Um quadro clínico de mastite pode evoluir de diferentes formas, tais como: cura espontânea, cura com antibioterapia, cura clínica sem que haja cura microbiológica (crônica), perda do quarto afetado e morte. A taxa de cura é o fator mais importante a ponderar na decisão do tratamento, uma vez que a taxa de cura influencia todos os fatores como custos e utilização de antibióticos (Hogeveen et al. 2014).

Como referido, o objetivo principal da realização de culturas bacterianas na vacaria é a identificação do agente patogénico envolvido de forma a direcionar o tratamento mais adequado. Não obstante, constitui num ponto crítico para reduzir a utilização de antibióticos nas explorações leiteiras (Ferreira et al. 2018).

Um fator limitante é o tempo de espera até que se inicie o protocolo terapêutico adequado, além dos custos envolvidos e também, quando realizado nas explorações, pode carecer de uma adequada formação dos operadores tanto na obtenção da amostra quanto da interpretação dos resultados (Rodrigues 2008; Keefe et al. 2011; Peek and Divers 2018).

De acordo com a multiplicação bacteriana presente, o resultado é classificado em: presença ou ausência. Em caso de desenvolvimento de colónias no meio sólido, é feita a classificação entre microrganismos Gram-positivo ou Gram-negativo. Além disso a placa *bi-plate* também permite diferenciar o crescimento bacteriano por *Staphylococcus aureus*. Já a *tri-plate*, além de permitir a mesma identificação que oferece a *bi-plate*, também é possível diferenciar entre crescimento de espécies de *Staphylococcus* vs *Streptococcus*. A amostra é considerada contaminada quando três ou mais bactérias são identificadas na mesma placa (Bradley et al. 2007).

No que diz respeito à escolha do produtor e médico veterinário responsável pela metodologia a se introduzir na exploração, é importante considerar a eficácia (precisão, especificidade, sensibilidade) dos mesmos, uma vez que há estudos que demonstram que a exatidão dos resultados dos testes difere entre métodos. Não obstante, a formação do pessoal responsável assim como a escolha do laboratório para observação de resultados, é importante a fim de evitar discrepâncias e incoerências (Ferreira et al. 2018). De uma forma geral, o método mais comum é a utilização de *bi-plates* ou *tri-plates*, placas com dois ou três meios de cultura, respetivamente, que possuem meios de cultura seletivos (Health 2004).

É importante ter em consideração a limitação da utilização desse sistema nas explorações, isso porque a cultura em placas de agar sangue realizadas, permitem a multiplicação de uma vasta gama de bactérias, mas raramente permitem mais do que um diagnóstico presuntivo de acordo com o aspeto da colónia. É o caso da identificação de *Staphylococcus spp*, agentes que podem ser responsáveis por infeção intramamária persistente, prejudicam a saúde do úbere e reduzem a produção de leite. A sua identificação pode ser fundamental para reduzir a disseminação de agentes patogénicos resistentes, porém existe uma limitação na identificação dos agentes não-*aureus* de *Staphylococcus* nessas

placas. Em contrapartida, os meios cromogénicos, através da inclusão de substratos de enzimas microbianas específicas, permitem identificar agentes patogénicos com maior precisão. No entanto, a gestão preventiva e terapêutica de muitas explorações se baseia no diagnóstico a nível mais geral, isto é, identificação de bactérias de Gram-positivo, Gram-negativo ou sem crescimento (Ferreira et al. 2018).

Um estudo realizado por Lagos et al. (2011) demonstrou que a utilização de um meio de cultura foi capaz de reduzir o uso de antibióticos para metade, não havendo apesar disso resultados significativamente diferentes em relação à sua não utilização no que respeita a cura clínica, a recorrência da mastite clínica, as CCS, produção de leite e taxa de sobrevivência.

Suojala et al. (2010, 2013) sugerem que a utilização de antibióticos para tratar vacas diagnosticadas com mastite por Gram-negativas não apresentam melhores resultados face às vacas não tratadas. Isso pode ser justificado pela cura espontânea orientada pelo sistema imunitário da vaca infetada.

Diversos autores concluíram que a utilização de antibióticos em casos de mastite por agentes Gram-negativos, só deve ser considerado em casos severos (Grau III) de mastite, devido ao risco de bacteriemia. Em casos ligeiros a moderados, é recomendada a utilização de AINEs para controlar a inflamação e consequentemente os sinais clínicos (Suojala et al. 2010; Lago et al. 2011a; Suojala et al. 2013).

Como referido anteriormente, 50% de toda utilização de antibióticos na exploração tem como destino o tratamento de mastite (Pol e Ruegg 2007). Os riscos associados a essa larga utilização incluem os resíduos dos antibióticos e o desenvolvimento de resistências aos mesmos (Lago et al. 2011a). Isso é ilustrado com o caso de *E. coli*, um dos agentes mais frequentes causadores de mastite, onde a utilização de antibióticos em grande escala ao longo de muitos anos, tem levado ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos tais como oxitetraciclina, sulfonamidas, ampicilina e estreptomicina (Suojala et al. 2013).

Apesar de não existirem diferenças significativas nas taxas de refugo ou morte nos grupos tratados com base no resultado da cultura bacteriana face a grupos que não realizaram cultura (Lago et al. 2011b), o falso diagnóstico de *Staphylococcus aureus* pode levar a abate prematuro de vacas, devido à sua baixa probabilidade de cura que representaria um grande custo (Ferreira et al. 2018). No mais, não estão igualmente reportadas diferenças da diminuição da CCS e produção de leite. Entretanto, são necessários novos estudos para saber essa prevalência e diferenças. Eventualmente poderá ser comparado a eficácia dos resultados entre grupos de antibióticos face ao agente envolvido (Suojala et al. 2010; Suojala et al. 2013).

Em suma, a utilização do meio de cultura seletivo para identificação tem o potencial de reduzir a utilização de antibióticos para metade (Lago et al. 2011a). A recolha de uma

amostra de leite para cultura é recomendada para identificar o agente, mas mastites severas (Grau III) devem ser tratadas imediatamente. No mais, a utilização de antibióticos deve ser orientada a casos de mastite por bactérias Gram-positivas, e a não utilização de antibióticos deve ser a primeira abordagem em mastite por bactérias Gram-negativas (Suojala et al. 2013).

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da utilização de um protocolo de tratamento seletivo de mastite clínica, através da realização de cultura bacteriana realizada em ambiente de vacaria. Esse objetivo engloba não só o aspeto financeiro, isto é, os custos diretos para realização do diagnóstico e tratamento da doença, mas também custos indiretos associados ao leite descartado.

Pretendeu também avaliar, e posteriormente discutir, a comparação entre animais nos quais se fez tratamento com antibiótico e animais nos quais este não foi feito no que diz respeito aos seguintes indicadores:

- Taxa de recorrência
- Taxa de refugo
- Taxa de cura

Assim, este estudo teve como objetivos específicos:

- a) Avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas na proporção de cura entre os dois grupos;
- b) Avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas na proporção de refugo entre os dois grupos;
- c) Avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas na proporção de recorrência entre os dois grupos;
- d) Determinar se o tratamento seletivo é economicamente benéfico ao produtor.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição da Exploração

O estudo foi realizado em uma exploração leiteira localizada em território português, mais especificadamente em Benavente. Essa exploração possui 1000 hectares (ha), onde 200 ha são de regadio. Com cerca de 1.000 animais, essa exploração explora intensivamente a raça Holstein Frísia. Cerca de 500 vacas em lactação são ordenhadas três vezes por dia e a média de produção chega aos 45/kg/dia (Março e Abril de 2020). Tem uma média de CCS que ronda as 300.000/cél/mL nos últimos 12 meses.

4.2 Recolha de informação

Os dados utilizados para realização dessa dissertação foram recolhidos do software de gestão da vacaria DairyPlan® onde se deu o estudo e foram distribuídos no programa Microsoft® Excel 2010. As vacas foram inscritas entre Maio de 2018 e Novembro de 2019.

Foram recolhidos registos da exploração para obtenção do contraste mensal de CCS, onde os animais foram contrastados sempre pela mesma equipa de contrastadores da Estação de Serviço de Apoio à Bovinicultura Leiteira (EABL), entre o dia 1 e 5 de cada mês. A identificação eletrónica dos animais é por pulseira e o registo das produções diárias recorre aos dados do software de gestão DairyPlan (GEA). Além disso, foram recolhidos registos para observação da taxa de cura, e produção diária de leite, para cálculo da quantidade média de leite descartado. Foi também observada para o estudo a folha do registo de refugos da vacaria.

4.3 Realização da cultura bacteriana e definição dos grupos

Uma vez realizado o diagnóstico de MC e tendo sido determinado o grau da doença de acordo com os sinais clínicos apresentados, é então realizada a cultura das amostras das vacas/quartos afetados (Figura 2). O procedimento da classificação da mastite, da coleta de amostra, até a sua incubação e interpretação de resultados é realizada pelos tratadores, os quais são treinados para estarem aptos a realizar o procedimento.

A exploração adotou a utilização do método de cultura (Vetorapid®, Vétoquinol) para caracterização do agente etiológico previamente ao tratamento da mastite. Esta placa é dividida em 3 compartimentos com meios seletivos para multiplicação de Gram-negativos, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Figura 3).

O primeiro passo para a realização da cultura inicia-se na sala de ordenha, com a desinfecção da extremidade do teto com algodão em álcool 70%. Em seguida, após eliminar os três primeiros jatos de leite, é feita a colheita da amostra de leite do quarto com mastite para um recipiente estéril. Após a coleta, é realizada a identificação da amostra com o número da vaca e do quarto mamário afetado. Por fim, a amostra é semeada em meio sólido (placa) e colocada na estufa a 37°C. A leitura dos resultados é realizada 24h após incubação. A exploração dispõe de uma estufa para realização da incubação das amostras, havendo apenas o custo associado à placa.

Apenas as vacas com casos não graves (grau I e II) foram elegíveis para o estudo. As vacas com casos graves (grau III) foram imediatamente tratadas com antibiótico, não sendo elegíveis.

Ao todo foram registados 332 casos de mastite para o estudo. Após a realização da cultura bacteriana na exploração, os casos foram distribuídos em dois grupos: tratadas com antibiótico e sem tratamento antibiótico.

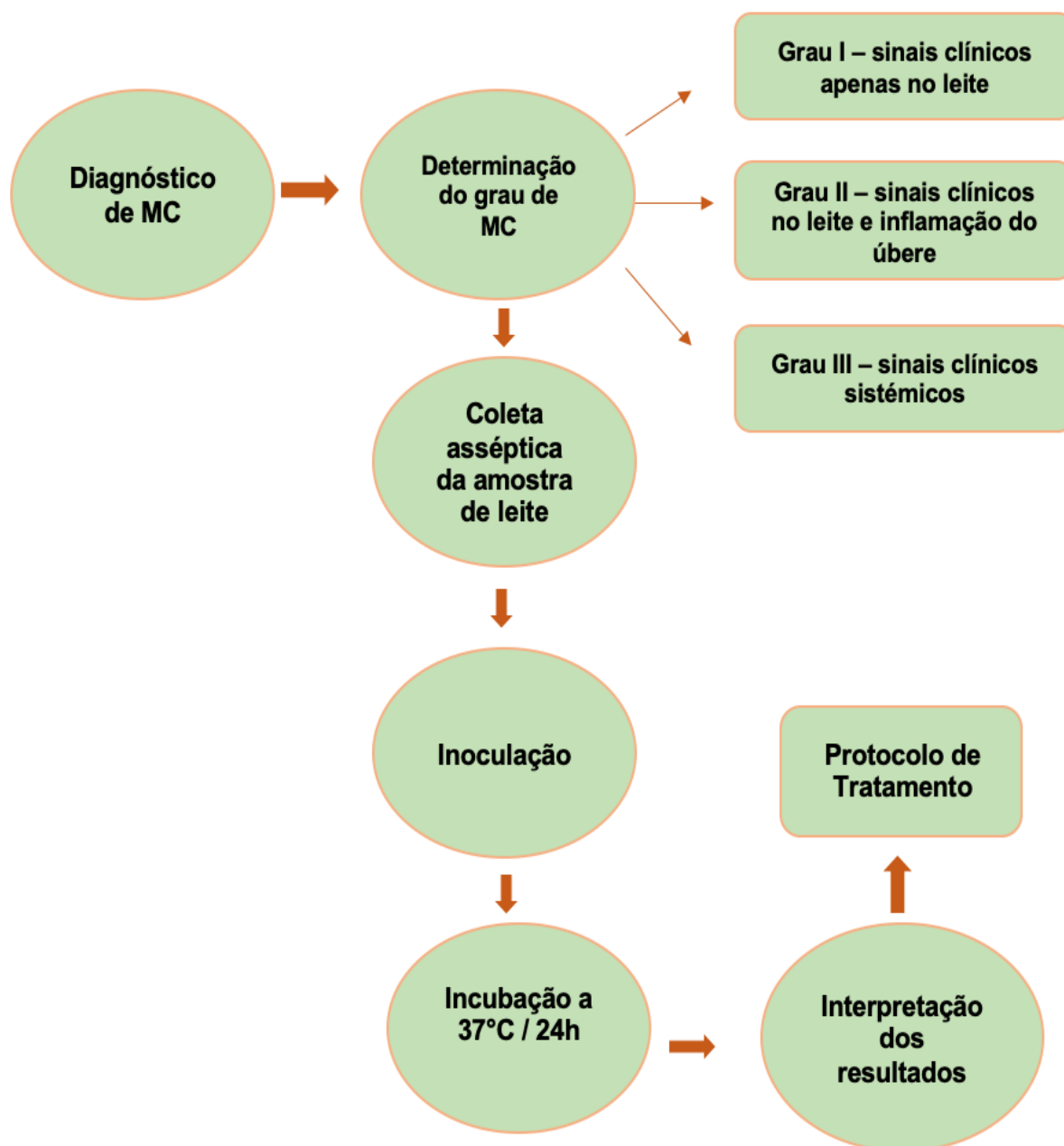


Figura 2. Etapas do programa de cultura na exploração para amostras de mastite clínica

Adaptado de: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/grupo-apoiar/cultura-microbiologica-na-fazenda-uma-ferramenta-na-tomada-de-decisao-208286/>

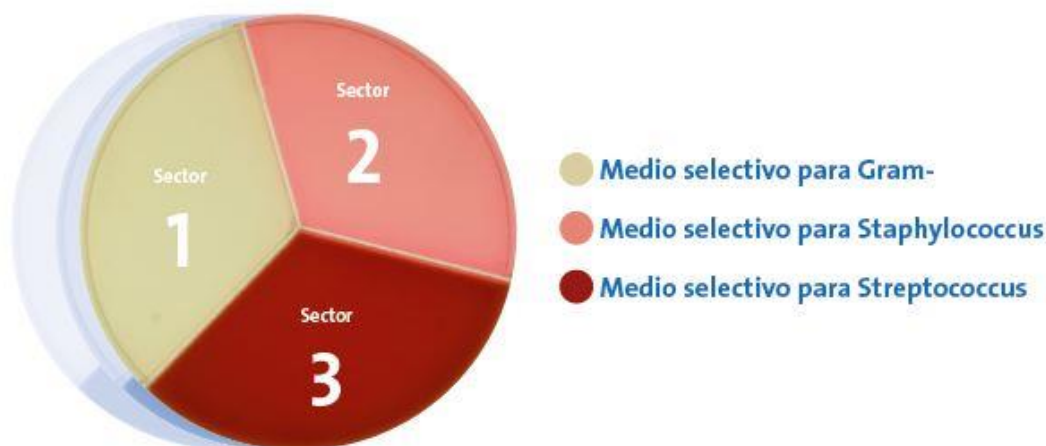


Figura 3. Placa Vetorapid com 3 compartimentos para identificação bacteriana

Adaptado de: <https://www.vetoquinol.es/content/vetorapid>

4.4 Definição das variáveis utilizadas

- a) **Refugo** – Foram quantificados os casos cujo refugo tenha ocorrido até 6 meses após o quadro clínico de mastite. Na ausência de informação da vaca na folha de registo, ou com refugo superior a esse intervalo, o refugo não foi considerado para o estudo. Para o custo associado ao refugo foi considerado o valor médio de 609 £ (Down et al. 2017), sendo em euro o equivalente a 673€ (valor convertido no dia 23/06/2020). Para avaliar o impacto económico que o refugo teve em cada um dos grupos, o valor de 673€ foi multiplicado pela quantidade de animais refugados em cada grupo e então, dividido pelo número total da amostra de cada um dos grupos, chegando ao valor médio de 12,94€ e 32,47€ para casos tratados com antibióticos e para o grupo dos casos sem tratamento, respetivamente.
- b) **Recorrência** – Foram considerados casos recorrentes todas vacas que tiveram mais de um episódio com intervalo mínimo ou igual a 14 dias.
- c) **Cura** – A cura foi considerada quando comparando CCS no mês anterior e posterior à mastite, havia uma redução de 400.000cél./mL.
- d) **Leite descartado** – A quantidade de leite descartado e seu respetivo valor foram calculados com base no valor médio de produção de leite registado pela exploração no ano decorrente da mastite a multiplicar pelo valor do litro de leite (0.33€). No ano de 2018 a média de produção foi 37L e no ano de 2019 foi 40L. Para os casos não tratados com antibiótico, foi considerado descarte de leite de 1 dia, correspondente ao

não aproveitamento do leite do quarto(s) afetado(s) enquanto este se mantinha visivelmente alterado, considerando-se o aproveitamento do leite dos restantes quartos, se saudáveis.

4.5 Método de tratamento da exploração

A presente exploração dispõe de dois protocolos (1 e 2) de tratamento para vacas diagnosticadas com mastite, propostos pelo médico veterinário responsável (Figura 4).

Após a confirmação da mastite clínica de grau I ou II, no dia do diagnóstico, todas as vacas recebem tratamento com anti-inflamatório não esteroide. Após o resultado da cultura, caso tivesse sido isolado uma bactéria Gram-positiva é realizado o protocolo 1 de tratamento (4 dias de tratamento onde são administrados AINE, injetores intramamários com antibióticos e antibióticos injetáveis, ao 7º dia a vaca poderá voltar ao parque). Se o caso piorar em gravidade ou não melhorar ao fim de 4 dias com o protocolo 1, muda-se para o protocolo 2 (5 dias de tratamento onde são administrados injetores intramamários com antibióticos e antibióticos injetáveis ao 9º dia a vaca poderá voltar ao parque). Vacas cujas amostras sejam negativas ou tenham sido observado o isolamento de Gram-negativos não são tratadas com antibióticos, apenas AINES no 1º dia.

Estes protocolos regem que vacas diagnosticadas com mastite sejam sempre tratadas com AINE no primeiro dia. O antibiótico é reservado para casos Gram-positivos após a realização e observação da cultura, com exceção a vacas com mastite grau III, que possuem indicação para antibioterapia imediata.

	Medicamento
PROTOCOLO 1	Bisnagas de Rilexine
	Tolfedine
	Marbocyl Injectável 10%
PROTOCOLO 2	Lincocin
	Cenmicin LC

Figura 4. Protocolos (1 e 2) de tratamento de mastite clínica realizados na exploração

4.6 Cálculo dos custos envolvidos

Para realização do cálculo médio dos custos envolvidos na mastite foram levados em consideração os seguintes indicadores: leite de descarte; custo do tratamento e diagnóstico (placa) e custo do refugo.

A tabela 10 indica os valores fornecidos e calculados para os indicadores mencionados:

Tabela 5. Indicadores envolvidos no custo da mastite e seus respectivos custos

	Custo
Placa	1,40 €
Protocolo 1¹	28,74 €
Protocolo 2²	31,37 €
AINE³	2,07 €
Descarte de leite 2018⁴ (Protocolo 1)	85,47 €
Descarte de leite 2018 (Protocolo 2)	109,89 €
Descarte de leite 2018 (ST⁵)	12,10 €
Descarte de leite 2019⁶ (Protocolo 1)	92,40 €
Descarte de leite 2019 (Protocolo 2)	118,80 €
Descarte de leite 2019 (ST)	13,20 €
Refugo (Tratadas com AB⁷)	12,94 €
Refugo (ST)	32,47 €

¹ já inclui o valor do AINE. Valor referente aos 4 dias de tratamento.

² valor referente aos 5 dias de tratamento.

³ anti-inflamatório não esteroide

⁴ litro do leite (0,33€) x produção média de leite em 2018

⁵ sem tratamento

⁶ litro do leite (0,33€) x produção média de leite em 2019

⁷ Antibiótico

Com base nos valores apresentados na tabela 10, foi calculado o custo médio de cada grupo (Tabela 11 e 12). Em seguida, foi calculada a respetiva contribuição (%) do impacto económico associado a cada um dos indicadores em cada um dos grupos. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 5 e 6.

Tabela 6. Custo médio da mastite tratada com antibiótico (AB)

Mastite Tratada com AB	Protocolo 1	Protocolo 2	Custo Médio
Placa	1,40 €	1,40 €	1,40 €
Protocolo 1 ou 2	28,74 €	31,37 €	30,05 €
Descarte de leite 2018/2019	88.93 €	114.34 €	101,64 €
Refugo	12,94 €	12,94 €	12,94 €
Total	144,72 €	147,35 €	146,03 €

Tabela 7. Custo médio da mastite sem tratamento (ST)

Mastite ST	Custo Médio
Placa	1,40 €
AINE	2,07 €
Descarte de Leite 2018/2019	12,65 €
Refugo	32,47 €
Total	48,59 €

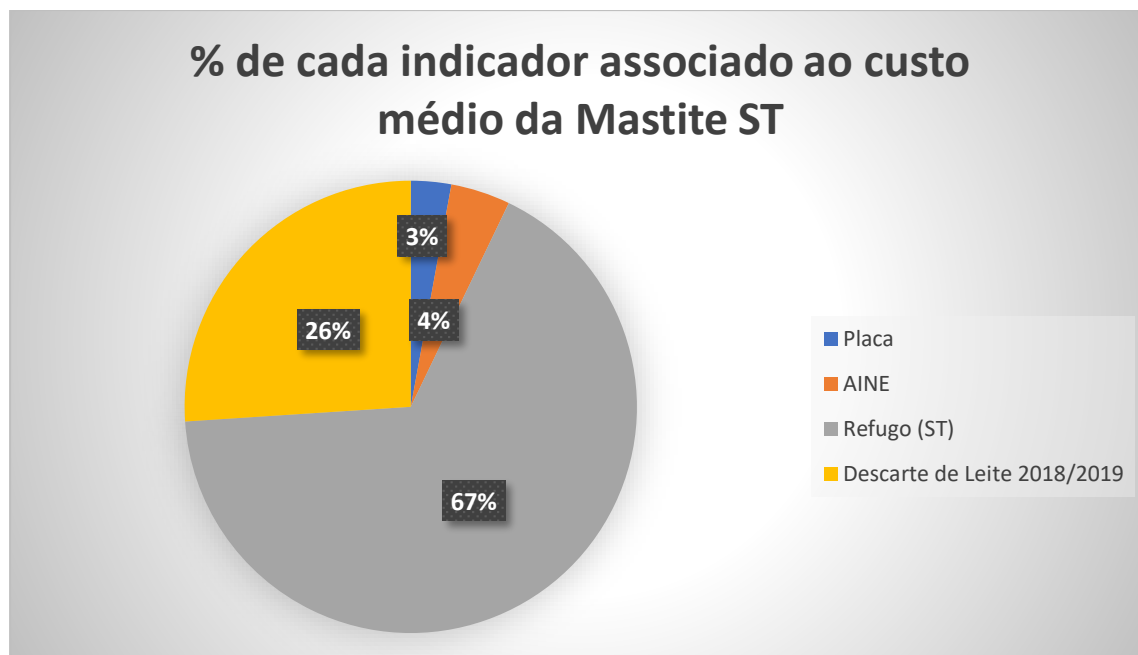


Figura 5. Gráfico da contribuição de cada indicador (%) envolvido no custo médio da mastite sem tratamento

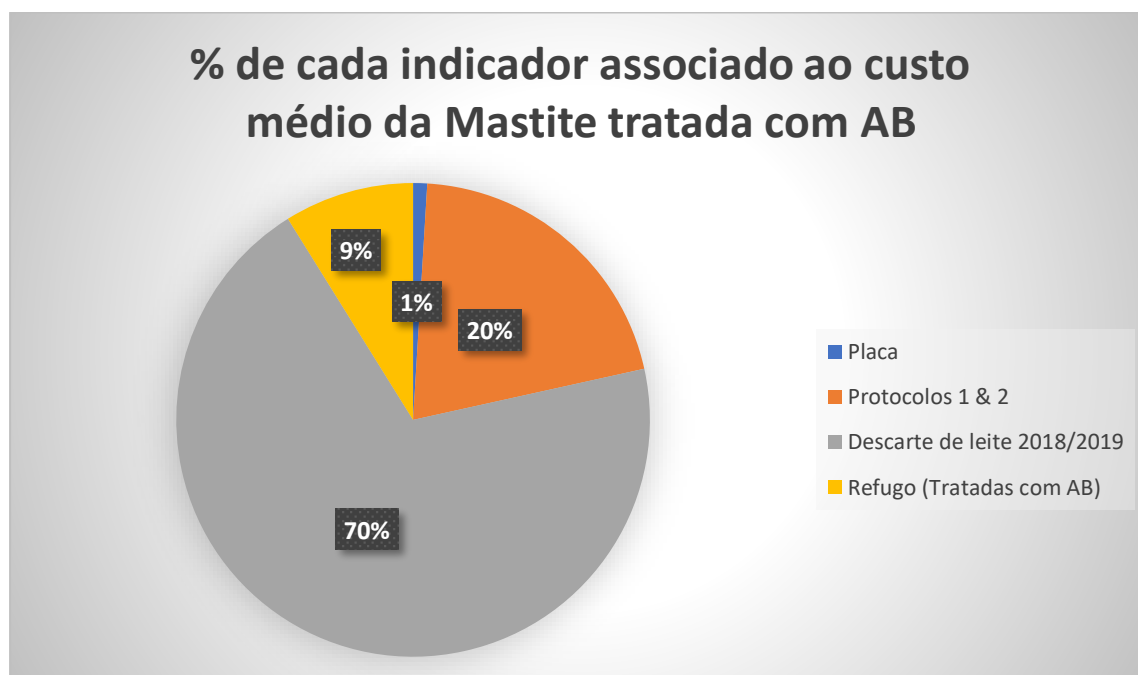


Figura 6. Gráfico da contribuição de cada indicador (%) envolvido no custo médio da mastite tratada com antibiótico

4.7 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o software SPSS-24.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Para realização da análise descritiva foram utilizados diversos indicadores para a distribuição das variáveis, nomeadamente a frequência, percentagem, média e desvio-padrão.

Para realização da análise inferencial e tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes paramétricos, e após realizado o teste da normalidade de Kolmogorov-Smirnov, cuja hipótese nula (H_0) é que os dados estão normalmente distribuídos, e dado que o resultado do valor de p foi $< 0,05$ para as variáveis em estudo (significância de 5%), rejeitamos a hipótese nula (H_0) e assumimos que a amostra não segue uma distribuição normal. Nesse sentido, foram utilizados testes não-paramétricos.

Para comparar o custo do leite descartado e o custo total em função do tratamento antibiótico (com tratamento e sem tratamento), foi aplicado o teste de Mann-Whitney que é o teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável pelo menos ordinal medida em duas amostras independentes (Marôco, 2014).

Para associar a variável Grupo de antibiótico (com tratamento e sem tratamento), a ocorrência de Cura, Refugo e Recorrência (Sim/Não), foi aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2), servindo para testar se duas ou mais populações (ou grupos) independentes diferem relativamente a uma determinada característica, isto é, se a frequência com que os elementos da amostra se repartem pelas classes de uma variável qualitativa é ou não aleatória. Foi também utilizada a Continuity Correctionb dado que se trata de tabelas de 2x2 (Marôco, 2014).

5. RESULTADOS

A amostra total (Figura 7) foi constituída por 332 casos de mastite, dos quais cerca de dois terços não foram tratados com antibiótico (n=228; 68,7%) e cerca de um terço dos casos foram tratados com antibiótico (n=104; 31,3%).

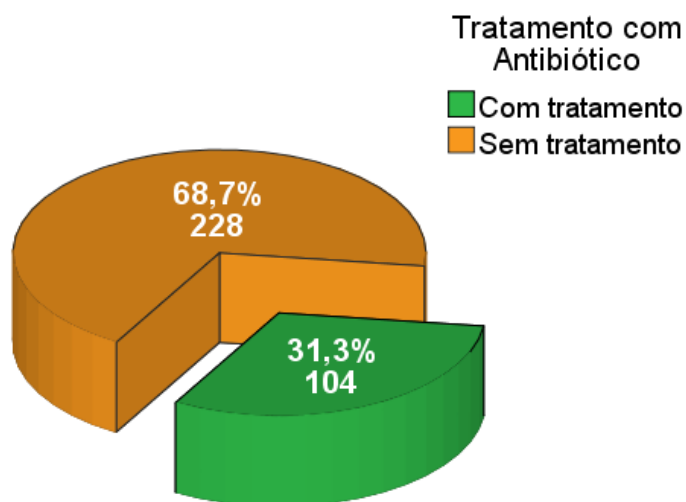


Figura 7. Gráfico de distribuição dos animais pelos grupos

5.1 Proporção de cura entre grupos

Do cruzamento das variáveis Tratamento antibiótico (com tratamento e sem tratamento) e a **ocorrência de cura** (Tabela 5), os resultados indicam que não foi observada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,182$) o que sugere que existe uma relação de independência entre as duas variáveis.

Verificamos que dos casos tratados em que houve cura (n=100), 35,6% pertenciam ao grupo tratado com antibiótico, enquanto 27,6% pertenciam ao grupo sem tratamento. Na maioria dos animais não houve cura (n=232, 69,9%).

Tabela 8. Teste de qui-quadrado para variáveis tratamento e ocorrência de cura

			Com tratam.	Sem tratam.	Total	<i>p</i>
Curou?	Não	N	67	165	232	
		% Curou	28,9%	71,1%	100,0%	
		% Grupo	64,4%	72,4%	69,9%	
	Sim	N	37	63	100	
		% Curou	37,0%	63,0%	100,0%	
		% Grupo	35,6%	27,6%	30,1%	
Total	N	104	228	332	0,182	
	% Curou	31,3%	68,7%	100,0%		
	% Grupo	100,0%	100,0%	100,0%		

5.2 Proporção de refugo entre grupos

Do cruzamento das variáveis Tratamento (com tratamento e sem tratamento) de antibiótico e a **ocorrência de Refugo** (Tabela 6), os resultados indicam que não se observou uma associação estatisticamente significativa ($p=0,337$) o que sugere que existe uma relação de independência entre as duas variáveis.

Neste sentido, verificamos que a maioria dos animais não foi refugado no período considerado ($n=319$, 96,1%), contudo, 4,8% dos animais sem tratamento foi refugado em comparação com 1,9% dos animais submetidos a tratamento.

Tabela 9. Teste de qui-quadrado para variável tratamento e ocorrência de refugo

			Com tratam.	Sem tratam.	Total	<i>p</i>
Refugada?	Não	N	102	217	319	0,337
		% Refugada	32,0%	68,0%	100,0%	
		% Grupo	98,1%	95,2%	96,1%	
	Sim	N	2	11	13	
		% Refugada	15,4%	84,6%	100,0%	
		% Grupo	1,9%	4,8%	3,9%	
Total	N	104	228	332		
	% Refugada	31,3%	68,7%	100,0%		
	% Grupo	100,0%	100,0%	100,0%		

5.3 Proporção de recorrência entre grupos

Do cruzamento das variáveis Tratamento antibiótico (com tratamento e sem tratamento) e **Recorrência** (Tabela 7), os resultados indicam uma associação estatisticamente significativa entre o Grupo (com tratamento e sem tratamento) e Recorrência ($p=0,005$) o que sugere que existe uma relação de dependência entre as duas variáveis.

Observou-se que em 56,6% dos animais do grupo sem tratamento, havia outros episódios de mastite, enquanto que no grupo dos animais que receberam tratamento com antibióticos a incidência de outros episódios de mastite foi de 39,4%.

Tabela 10. Teste de qui-quadrado para variável tratamento e recorrência

			Com tratam.	Sem tratam.	Total	<i>p</i>
Recorrência?	Não	N	63	99	162	
		% Recorrência	38,9%	61,1%	100,0%	
		% Grupo	60,6%	43,4%	48,8%	
	Sim	N	41	129	170	
		% Recorrência	24,1%	75,9%	100,0%	
		% Grupo	39,4%	56,6%	51,2%	
Total	N	104	228	332		
	% Recorrência	31,3%	68,7%	100,0%		
	% Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	0,005	

5.4 Leite descartado e custo total entre grupos

Da comparação do **custo do Leite Descartado** e do **Custo Total** entre o tipo de Tratamento com Antibiótico (com tratamento e sem tratamento) (Tabela 8), os resultados indicam que existem diferenças estatisticamente significativas, nomeadamente no custo do Leite Descartado ($p=0,000$) e no Custo Total ($p=0,000$), cujos valores médios foram superiores no grupo de animais com tratamento com antibiótico.

Tabela 11. Teste de comparação entre os dois grupos

	Com tratamento					Sem tratamento					<i>p</i>
	N	Média	Dp	Min	Máx	N	Média	Dp	Min	Máx	
Leite descartado	104	95,1	14,0	85,5	145,2	228	13,0	0,4	12,2	13,2	0,000
Custo total	104	127,1	19,5	115,6	206,7	228	14,4	0,3	13,6	14,6	0,000

5.5 Leite descartado e custo total entre tipos de protocolos no grupo tratado

Da comparação do custo do Leite Descartado e do Custo Total entre o **Tipo de Protocolo (Protocolo 1 e Protocolo 2)** (Tabela 9), os resultados indicam que existem diferenças estatisticamente significativas, nomeadamente no Leite descartado ($p=0,000$) e no Custo Total ($p=0,000$), cujos valores médios foram superiores no Protocolo 2.

Tabela 12. Teste de comparação entre os dois tipos de protocolo

	Protocolo 1					Protocolo 2					<i>p</i>
	N	Média	Dp	Min	Máx	N	Média	Dp	Min	Máx	
Leite descartado	85	89,1	3,5	85,5	92,4	19	122,1	10,9	92,4	145,2	0,000
Custo total	85	119,2	3,5	115,6	122,5	19	162,3	23,0	122,5	206,7	0,000

6. DISCUSSÃO

A exploração leiteira é uma das principais atividades económicas do setor agrícola de alta produção, contribuindo significativamente para o PIB e para o emprego no setor primário (Sottomayor et al. 2012). Sendo a mastite clínica a doença mais prevalente nas explorações leiteiras é evidente a necessidade de controlar e prevenir os prejuízos associados a essa doença, prejuízo este que está associado maioritariamente a utilização de antibióticos, não só pelo seu custo, mas principalmente pelo descarte de leite decorrente da sua utilização.

A redução dos prejuízos dessa doença passa pelo controle e prevenção a partir de uma série de medidas. Para tal, é necessário avaliar o custo-benefício de cada uma, considerando as especificidades de cada exploração. A MC é uma doença cujo prejuízo aumenta diariamente após o seu diagnóstico, por isso é importante ter uma abordagem clara e rápida a fim de que haja um retorno económico ao produtor.

Um dos pontos chave é fazer com que o produtor entenda os reais custos dessa doença na exploração, e como fazer uma abordagem direta e objetiva. Huijps et al. (2008) menciona em seu artigo que a principal fraqueza na análise do custo dessa doença são os cálculos “irreais” (altos ou baixos) por parte dos produtores, onde muitos subestimam os custos associados às perdas de produção ou mesmo as perdas económicas. Isto é, na perspetiva do produtor a diferença entre às perdas económicas esperadas e as perdas reais associada a esta doença na exploração, pode ser muito baixa quando na verdade são altas.

Anteriormente a medida praticada nas explorações era que toda MC deveria ser tratada com antibióticos. Atualmente, sabe-se que esta pode não ser a melhor abordagem, tanto a nível económico quanto a nível terapêutico. Neste sentido, o papel do médico veterinário passa por apresentar ao produtor qual o caminho entre o benefício vs custos que melhor se adequará à exploração para gerir a mastite, sempre considerando as especificidades de cada uma.

Uma das medidas mais discutidas atualmente e aceite por muitos médicos e investigadores, é a utilização de um tratamento seletivo, isto é, tratar apenas casos que devem ser tratados. Diversos estudos concluíram que mais de 30% das culturas realizadas em vacarias de leite não apresentam multiplicação bacteriana ou apresentam multiplicação de agentes Gram-negativos, dispensando a utilização de antibióticos (Lago et al. 2011a)

Com base nessa medida e considerando os aspetos económicos envolventes na doença, foi realizado este estudo. Podemos verificar que ao realizar cultura bacteriana, 68,7% dos casos de MC foram desconsiderados do tratamento com antibióticos, reduzindo dessa forma o descarte de leite de 7 dias em média (vacas tratadas) para 1 dia (sem tratamento). Traduzindo este resultado em números, caso o produtor tivesse optado por uma terapêutica sem recurso ao tratamento seletivo, teríamos um custo médio de € 43.721,08 (n=332 x

descarte de leite x custo médio do tratamento) associado a mastite no período de 2018/2019. Por outro lado, ao recorrer a cultura bacteriana, dentro deste mesmo período, o custo médio total (MC sem tratamento e MC tratada com antibiótico) foi de €17.516,72. Esta diferença representa uma diminuição de aproximadamente 60% no impacto económico da doença se realizado o tratamento seletivo por meio da realização da cultura bacteriana. A este cálculo não foram somados outros fatores determinantes no custo da doença, a não ser o descarte do leite, custo das placas para cultura bacteriana e antibioterapia. No entanto, os valores adicionais teriam impacto em ambos os grupos, e apesar do valor apresentado ser subestimado, a estimativa da redução dos custos com a placa seria de igual forma significativa.

Através dos resultados obtidos, assumimos que o custo médio da MC tratada com antibióticos é de 146,03€/caso, e de uma MC sem tratamento é de 48,59€/caso. Na MC tratada com antibióticos, o descarte do leite (70%) representou o maior prejuízo associado a doença, enquanto que na MC sem tratamento o descarte de leite representou 26% dos custos, sendo o maior custo representado pelo custo associado ao refugo (67%).

O resultado obtido referente a proporção de cura não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados e sem tratamento ($p=0,182$), o que corrobora as conclusões apresentadas por Lagos et al (2011). A cura espontânea é frequentemente evidente principalmente em casos provocados por agentes Gram-negativos, o que poderá justificar a ocorrência de cura sem a necessidade de um antibiótico e, portanto, sem diferença significativa entre os grupos. A esta cura espontânea está associada um agente causal envolvido e as características fisiológicas do animal infetado, nomeadamente uma resposta imunitária eficaz (Lago et al. 2011b; Fuenzalida e Ruegg 2019).

Por outro lado, a falha na terapêutica ou ausência de cura, pode apresentar diversas causas, dentre elas, a presença de um agente não cultivável em placas, a utilização inadequada e menos eficaz do fármaco escolhido, resistência bacteriana, má prática na realização da cultura, má classificação da mastite, e resultados de cultura falso-negativos (Fuenzalida e Ruegg 2019).

Quanto ao refugo, o estudo demonstrou que a diferença deste entre grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,337$), ainda assim é um fator importante a ser considerado durante a análise dos custos gerais/prejuízos da doença. Os custos associados ao refugo são difíceis de estimar pois implicam a perda de produção (quanto maior a produção da vaca refugada maior será o prejuízo), valor da vaca de substituição, produção mensal de leite da vaca substituinte, valor pela carcaça da vaca refugada, ou seja, a diferença entre o valor líquido atual e o retorno esperado (Huijps et al. 2008).

Apesar do seu grande impacto económico no quadro geral de custos, a baixa incidência demonstrada nesse estudo ajudou com que esse impacto fosse diluído em todos

os animais com MC em seus respectivos grupos. Isto é, o custo por caso é maior em animais ST (32,47€) do que em comparação a animais tratados com antibiótico (12,94€) devido a uma maior representatividade de refugos (4,8%) do grupo sem tratamento face ao grupo antibiótico (1,9%). A proporção de refugo, assim como a proporção de cura, corrobora as conclusões apresentadas por Lagos et al (2011), onde não foram evidenciadas diferenças significativas.

Um dos indicadores que apresentou uma diferença estatisticamente significativa foi a proporção de recorrência entre grupos ($p=0,005$), onde o grupo sem tratamento apresentou uma maior incidência de recorrência (56.6%) em comparação com o grupo tratado com antibiótico (39.4%). Este resultado corrobora o mencionado por Fuenzalida e Ruegg (2019), em que a opção de não tratamento poderá potencializar a ocorrência de resultados falsos-negativos, e também, uma vaca infetada subclínicamente aumenta o risco de recorrência e aumenta o potencial para transmissão contagiosa entre as vacas no parque. Além disso, o artigo realizado por Rollin et al. (2015), cita que em média uma vaca com mastite tem 33% de probabilidade de ter uma recorrência (% de casos com um segundo episódio) e 13% de probabilidade de vir a ocorrer um terceiro caso (% de casos com um terceiro episódio).

Por isto, é de suma importância citar que os casos recorrentes implicam um maior custo da doença, e seu prejuízo está associado principalmente as perdas na produção de leite (Huijps et al. 2008). Desta forma, a taxa de recorrência é com certeza um fator que deve ser levado em consideração durante a análise dos custos gerais associados a esta doença. É um custo oculto, difícil de ser estimado, porém relevante.

Dito isto, de forma a reduzir o impacto global da doença, o produtor deve compreender a importância de integrar na exploração um manejo efetivo preventivo da doença. Maneio este que passa principalmente pelo diagnóstico das mastites subclínicas e o manejo seletivo das mastites crônicas a fim de reduzir o índice de transmissibilidade e prevalência da doença dentro do efetivo.

As perdas de produção das vacas com mastite clínica são também um custo oculto porém significativo, a ser considerado, uma vez que estas vacas doentes são frequentemente vacas de alta produção antes de contraírem a doença, e mesmo após isso, podem continuar a produzir mais em comparação a uma vaca saudável com menor produção (Huijps et al. 2008).

Do resultado da comparação do descarte de leite entre grupos e depois entre protocolos de tratamento dos casos submetidos a antibioterapia, o resultado foi estatisticamente significativo. O resultado obtido já era o esperado uma vez que há maior descarte de leite nos casos tratados com antibiótico, conseqüentemente há um maior prejuízo, e a mesma lógica se aplica a comparação entre protocolos.

Sabe-se que a realização da cultura bacteriana é um apoio ao tratamento das mastites visando a redução dos dias de descarte de leite (Fuenzalida and Ruegg 2019).

No presente estudo, como esperado, houve uma tendência para maior descarte de leite em casos tratados com antibióticos e um tratamento mais dispendioso. Quanto ao descarte de leite, neste estudo, foi o que também maior representou o prejuízo associado a doença no grupo dos casos tratados com antibiótico. O real custo do leite não comercializado depende de como a exploração faz uso do mesmo. No caso do presente estudo, e considerando a prática da exploração onde se deu o mesmo, todo leite não comercializado foi descartado, resultando numa perda total do seu valor.

Lembrando que, a utilização do leite não comercializado por parte dos produtores deve ser cuidadosamente avaliada, deve ser levado em consideração a sua qualidade nutricional, contaminação bacteriana, potencial de transmissão de doenças infecciosas como a paratuberculose e o risco de potencialização da resistência antimicrobiana.

Este estudo teve como objetivo principal avaliar os benefícios económicos da utilização de um método de cultura bacteriana no apoio à decisão terapêutica face à mastite clínica e não avaliar os custos gerais associados a doença em si. Dessa forma, não foram levados em consideração todos os custos envolventes da mastite (custos de prevenção, aumento da mão-de-obra, serviço médico-veterinário, penalizações).

Das análises realizadas e dos resultados obtidos através dos dados e gestão da doença nessa exploração, considerando o índice de mastite associado a amostras a partir das quais foi possível isolar bactérias de Gram-positivo, e crescimento Gram-negativo ou negativas, é possível afirmar que nesta exploração a utilização de um método de cultura bacteriana resulta em um menor impacto global da doença. Apesar da taxa de recorrência ter apresentado resultados significativos, sendo a prevalência maior no grupo ST, e do seu custo ter grande influência no impacto global da doença, ainda assim justifica-se a utilização de um tratamento seletivo, uma vez que o descarte de leite é o que mais acarreta prejuízos ao produtor nessa exploração e, além disso, a recorrência pode ser melhor gerida na implementação de um manejo preventivo eficaz.

Através da redução da utilização de antibióticos, podemos então reduzir o descarte de leite, ter um menor gasto com antibióticos e de forma geral, diminuir o impacto da doença. Além disso, a utilização de antibióticos não afeta positivamente nenhum dos parâmetros apresentados, isto é, não é benéfico em resultados terapêuticos, não sendo justificado no todo a sua utilização de forma rotineira sem um diagnóstico devidamente confirmado da mastite.

7. CONCLUSÃO

Embora os valores apresentados não englobem todos os custos associados e envolvidos nos casos clínicos da doença, é possível estimar, e com base nos resultados apresentados, que a MC tratada com antibiótico tem um maior custo. E apesar de ter um maior custo, em alguns quadros clínicos, por exemplo a mastite de grau III, a sua utilização é indispensável. Entretanto, considerando os resultados desta exploração, sabemos que a realização de culturas bacterianas foi benéfica para a mesma, por permitir reduzir a utilização de antibiótico, consequentemente diminuir o desperdício de descarte de leite, principalmente em casos cujo tratamento com estes fármacos é dispensável.

Os casos de mastite por agentes Gram-negativos e/ou negativos representaram 68% de todos os casos de mastite no período entre 2018/2019. Ao realizarmos culturas bacterianas na exploração, foi permitido que esses casos fossem identificados e consequentemente fossem direcionados ao tratamento mais adequado, evitando a antibioterapia como decisão inicial de tratamento para casos não eleitos para tal. Isto é, conhecendo o agente causal (Gram-positivo ou Gram-negativo) ou mesmo a obtenção de um resultado negativo, é possível num curto intervalo de tempo, escolher em cada caso a atuação terapêutica mais adequada.

Os resultados observados indicam que o grupo tratado com antibiótico apresenta um resultado clínico semelhante ao grupo sem tratamento. No entanto, outros estudos e pesquisas utilizando um maior número amostral e comparando protocolos de tratamento (diferentes antibióticos) podem ser importantes para obter resultados mais consideráveis.

Considerando também o baixo custo da cultura (1,40€), que representa apenas 1% e 3% do custo da MC sem tratamento e MC tratada com antibiótico, respetivamente, e a precisão dos resultados, certamente é uma ferramenta a ser explorada com grandes benefícios para o produtor.

Embora o reduzido número da amostra principalmente no grupo dos casos tratados com antibiótico tenha enfraquecido os resultados das análises estatísticas, podemos dizer que através da amostragem observada nessa exploração e seus resultados e performance, a utilização de um protocolo beneficia economicamente o produtor na gestão dessa doença.

A utilização da cultura bacteriana para um tratamento seletivo, além de reduzir o impacto económico direto associado a utilização de antibióticos, também reduz a possibilidade da instalação de resistência antibacteriana na exploração. A esta resistência podem estar associadas uma baixa taxa de cura, alta taxa de refugo e recorrência, tudo isso contribuindo para o aumento do prejuízo do produtor com esta doença, já para não falar da sua potencial contribuição para a melhoria da Saúde Pública.

A utilização de antibióticos deve ser responsável e ponderada. A utilização de um sistema de tratamento seletivo para mastite clínica deve ser sempre priorizada nesta exploração leiteira.

Sendo uma doença multifatorial, de difícil controle, e alto custo, não apresentando nenhuma medida totalmente eficaz, a ferramenta mais bem-sucedida continua sendo a prevenção da ocorrência de novos casos através das boas práticas de manejo, e o refúgio seletivo de vacas com mastite crônica no efetivo.

Por fim, uma maior amostra poderia alcançar uma melhor validação dos resultados apresentados neste estudo. Além disso, quando nos referimos ao impacto da mastite numa exploração, e ao avaliarmos resultados terapêuticos entre grupos, a fim de obtermos resultados mais conclusivos, é importante levar em consideração outros indicadores associados ao impacto da mastite, fatores estes que implicam diretamente no custo final da doença. Além disso, este estudo foi realizado apenas considerando os resultados da cultura bacteriana como Gram-positivo ou Gram-negativo/sem crescimento, não tendo sido realizada a identificação do agente, o que poderia num futuro estudo, aprimorar os resultados. No mais, a comparação de protocolos de tratamento (diferentes antibióticos) poderá vir apresentar resultados significativos na gestão desta doença na exploração.

Os resultados aqui apresentados e toda discussão realizada servem como base para continuação ou futuros estudos tanto nesta exploração como em outras. No entanto, apesar de ter sido apresentado um contexto geral da doença, é necessário que cada exploração enquadre a sua realidade neste contexto, considerando as suas especificidades, podendo assim ter resultados diferentes ou semelhantes.

8. BIBLIOGRAFIA

Acosta AC, da Silva LBG, Medeiros ES, Pinheiro, Júnio JW, Mota RA. 2016. Mastitis in ruminants in Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 36(7):565–573. doi:10.1590/S0100-736X2016000700001.

Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. 2008. *Bovine medicine: Disease and husbandry of cattle*, 2nd ed. Blackwell Science.

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

Blowey R, Edmondson P. 2010. *Mastitis control in dairy herds*, 2th ed. Reino Unido: CABI

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. doi:10.1136/vr.160.8.253.

Brunton LA, Duncan D, Coldham NG, Snow LC, Jones JR. 2012. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet Rec.* 171(12):296. doi:10.1136/vr.100924.

Cannas da Silva J, Sofia van Harten S, Roque E. 2018. Considerações sobre mastites bovinas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.Faculdade de Medicina Veterinária.

Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Gruenberg W. 2016. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 11th ed. Elsevier.

Coutinho M. 2014. Avaliação da relação entre contagens de células somáticas e os agentes mais prevalentes de mastite em explorações leiteiras da região de entre Douro e Vouga. Univ Lusófona Humanidades e Tecnologias. Faculdade de Medicina Veterinária. <http://recil.grupolusofona.pt/handle/10437/4734>.

Cunningham JG. 2012. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*, 5th ed. Elsevier.

Degen S, Paduch JH, Hoedemaker M, Krömker V. 2015. Factors affecting the probability of bacteriological cure of bovine mastitis. [s.n] 43(4):222–227. doi:10.15653/TPG-141082.

Down PM, Bradley AJ, Breen JE, Green MJ. 2017. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med.* 145:91–99. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.07.006.

FAO. 2014. Impact of mastitis in smal scale dairy production systems. <http://www.fao.org/3/a-i3377e.pdf>.

Ferreira JC, Gomes MS, Bonsaglia ECR, Canisso IF, Garrett EF, Stewart JL, Zhou Z, Lima FS. 2018. Comparative analysis of four commercial on-farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle. *PLoS One*. 13(3):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0194211.

Fonseca MP da. 2015. Custos diretos das mastites em duas explorações de bovinos leiteiros. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. <http://hdl.handle.net/10400.5/10507>

Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD. 2009. Anatomy and Physiology of Farm Animals. *Can Vet J*. 7(11):267.

Fuenzalida MJ, Ruegg PL. 2019. Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate use of intramammary ceftiofur for treatment of nonsevere culture-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci*. 102(4):3321–3338. doi:10.3168/jds.2018-15497.

Gómez OEQ, Santivañez CSB, Arauco FV, Espezua OHF, Manrique JM. 2015. Interpretation criteria for California mastitis test in the diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Rev Investig Vet del Peru*. 26(1):86–95. doi:10.15381/rivep.v26i1.10912.

Hand KJ, Godkin A, Kelton DF. 2012. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *J Dairy Sci*. 95(3):1358–1362. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4927>.

Health L for U. 2004. Minnesota Easy Culture System II user's manual. Minnesota Vet Diagnostic Lab Univ Minnesota, Saint Paul, MN.

Hogeveen H, Huijps K, Lam TJGM. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J*. 59(1):16–23. doi:10.1080/00480169.2011.547165.

Hogeveen H, Kamphuis C, Steeneveld W. 2014. Treating mastitis: Balancing cure, money, welfare and resistance. *Proc Natl Mastit Counc 53rd Annual Meeting* (3-16)

Huijps, K., Lam, T., & Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: Facts and perception. *J Dairy Res*. 75(1), 113-120. doi:10.1017/S0022029907002932

Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. 2011a. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J Dairy Sci*. 94(9):4441–4456. doi:10.3168/jds.2010-4046.

Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. 2011b. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *J Dairy Sci*. 94(9):4457–4467. doi:10.3168/jds.2010-4047.

Makovec JA, Ruegg PL. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci*. 86(11):3466–3472. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-4.

Marôco, J. 2014. *Análise Estatística: Com o SPSS Statistics*, 6th ed. Lisboa: Report Number. ISBN 978-989-96763-4-3

Nielsen C. 2009. *Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows*. Swedish University of Agricultural Sciences.

Nunes G, Blagitz M, Freitas C, Souza F, Ricciardi M, Stricagnolo C, Sanches B, Azedo M, Sucupira M, Della Libera A. 2008. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*. 75(3):271–278.

Peek SF, Divers TJ. 2018. *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 3rd ed. Elsevier.

Pol M, Ruegg PL. 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci*. 90(1):262–273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)72627-9.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd ed. Wiley-Blackwell.

Rodrigues, AC. 2008. *Identificação bacteriana a campo da mastite bovina para orientar protocolos de tratamento*. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Scott PR, Penny CD, Macrae AI. 2011. *Cattle Medicine*, 1st ed. CRC Press. Scott, PR., Penny, CD. and Macrae, AI., 2011. Roslin, Midlothian, UK: Manson Publishing/The Veterinary Press. <https://www.vet-ebooks.com/cattle-medicine-1st-edition>

Serrenho RT da LC. 2015. *Caracterização da qualidade do leite e do impacto económico das mastites em três bacias leiteiras em Portugal: ilha de S. Miguel - Açores, Entre-Douro-e-Minho e região Centro do país*. Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária. <http://hdl.handle.net/10400.5/10389>.

Simões TVMD, Oliveira AA de. 2012. *Mastite Bovina, Considerações e Impactos Econômicos*. Embrapa.

Smith BP. 2008. *Large Animal Internal Medicine*, 4th ed. Elsevier.

Smith BP. 2014. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. Elsevier.

Sottomayor M, Costa LL, Ferreira MP. 2012. Impacto da Reforma da PAC Pós-2013 no Setor do Leite em Portugal. :108.

Suojala L, Kaartinen L, Pyörälä S. 2013. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *J Vet Pharmacol Ther*. 36(6):521–531. doi:10.1111/jvp.12057.

Suojala L, Simojoki H, Mustonen K, Kaartinen L, Pyörälä S. 2010. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci*. 93(5):1960–1969. doi:10.3168/jds.2009-2462.

