



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
Artigo de revisão

**O MASTATEST, TÉCNICA INOVADORA NA DETEÇÃO DE MASTITES EM BOVINOS, ESTUDO
COMPARATIVO**

Justine Annie Christiane Herlemont

Coimbra, 16 de julho 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
Artigo de revisão

**O MASTATEST, TÉCNICA INOVADORA NA DETEÇÃO DE MASTITES EM BOVINOS, ESTUDO
COMPARATIVO**

Coimbra, 16 de julho 2024

Justine Annie Christiane Herlemont

Constituição do Júri

Presidente do Júri:
Professora Doutora Maria
Eduarda Moreno da Silveira

Arguente: Professora
Doutora Carla Isabel Silva
Miranda

Orientador: Professora
Doutora Joana Leal Freire
Quelhas Reis

Trabalho realizado sob a orientação da

Professora Doutora Joana Leal Freire Quelhas
Reis e Coorientação do Dr. Luís Miguel
Miranda



Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos
Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Escola Universitária Vasco da Gama, por me dar a oportunidade de estudar na sua instituição, por me ensinar e me permitir exercer a profissão desejada.

Agradeço também ao meu orientador e co-orientador que me ajudaram no desenvolvimento deste artigo permitindo-me obter o meu diploma, e que me apoiaram quando fui stressada.

Agradeço M. Bellais e o laboratório Vetoquinol por me fornecer bibliografia e informações sobre o dispositivo, e também agradeço todas as entidades de acolhimento que me receberam durante os anos de formação.

Agradeço aos meus amigos em França, que nunca se afastaram de mim durante os meus estudos no estrangeiro e aos que em Portugal mudaram a minha vida da melhor forma possível. Agradeço-lhes por me permitirem ser feliz durante os meus estudos e descobrir muito mais do que eu imaginava.

Por fim, agradeço à minha família, que sempre me apoiou e sem a qual nada disso teria sido possível. Foram o apoio financeiro e emocional que me permitiu alcançar o meu sonho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
ÍNDICE DE TABELAS	v
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 MASTITES BOVINAS.....	5
2.1 DEFINIÇÃO E PATOGÊNESE	5
2.2 TIPOS DE MASTITES	6
2.3 SINAIS CLÍNICOS	8
2.4 DIAGNÓSTICO.....	9
2.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)	10
2.4.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	10
2.4.3 Métodos baseados em proteómica.....	11
2.5 TRATAMENTO.....	11
2.5.1 Antibioterapia.....	11
2.5.2 Bacteriófagos e suas endolisinas.....	12
2.5.3 Probióticos e peptídeos antimicrobianos	13
2.5.4 Fitoterapia	13
2.5.5 Imunoterapia	14
2.5.6 Nanopartículas.....	14
2.5.7 Fatores de secreção nativos.....	15
2.6 PREVENÇÃO E GESTÃO DAS MASTITES	15
2.6.1 Seleção genética	16
2.6.2 Nutrição.....	16
2.6.3 Terapia durante o período de secagem	17
2.6.4 Selante de teto	17
3. O MASTATEST®	18
3.1 MODO DE FUNCIONAMENTO	18
3.2 MODO DE UTILIZAÇÃO	20
3.3 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO DISPOSITIVO	21
4. COMPARAÇÃO DO DISPOSITIVO COM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAIS	22
4.1 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE CULTURA DE GÉIS	22
4.2 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO CROMOGENICO BIPLACAS OU TRIPLACAS	25
4.3 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE CULTURA DE AGAR E TESTE DE LATEX SEGUIDO DE CONFIRMAÇÃO COM ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF PARA MASTITE SUBCLINICA.....	27
5. CONCLUSÃO	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: O mastatest® na direita e a cassette de teste na frente (<i>Mastatest®</i> , 2024).....	19
Figura 2: A cassette de análise antes e depois das 24 horas, com a repartição nos poços (<i>Salat</i> , 2022).....	19
Figura 3: Instruções do fabricante para o uso do mastatest® (<i>Mastatest®</i> , 2024).....	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Correspondência entre o mastatest® e a técnica de cultura de géis para identificar o género e a espécie (<i>Salat</i> , 2022)	24
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das mastites de acordo com o agente etiológico (<i>Cheng</i> , 2020, <i>Descôteaux</i> , 2004, <i>Kour</i> , 2023).....	7
Tabela 2: Sinais clínicos observados em função do grau de mastite (<i>Cheng</i> , 2020, <i>Descôteaux</i> , 2004, <i>Kour</i> , 2023 e <i>Salat</i> , 2023)	8
Tabela 3: Percentagem de correspondência dos resultados entre o mastatest® e o método de cultura de géis (<i>Salat</i> , 2022)	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANC: ácido nalidixico e colistina

CCS : contagem células somáticas

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CS : células somáticas

E.coli: *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FDA: food and drug administration

Ig: Imunoglobulina

IL-2: interleucina-2

SIT: selante interno de teto

IMI: infeções intramamária

Lactococcus lactis subsp. lactis CRL 1655 : *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* na coleção cultura microrganismos com número de identificação 1655

L. perolens CRL 1724 : *Lactobacillus perolens* subespécie *lactis* na coleção cultura microrganismos com número de identificação 1724

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

NIIM: novas infeções intramamária

NMC: National Mastitis council

PCR: polymerase chain reaction

PH: penetamato hidroide

pH: potencialhidrogénio

RPF : Rabbit plasma fibrogen

RT-PCR: polymerase chain reaction in real time

S. agalactiae: *Streptococcus agalactiae*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SCN: *staphylococcus coagulase* negativos

S. dysgalactiae: *Streptococcus dysgaactiae*

Se : sensibilidade

Sp : especificidade

S. uberis: *Streptococcus uberis*

TCM : teste californiano de mastite

T. pyogenes: *Trueperella pyogenes*

UFC : unidade formadora de colónias

UV: ultravioleta

O mastatest, técnica inovadora na deteção de mastites em bovinos, estudo comparativo

Justine Annie Christiane Herlemont, Luís Miguel Miranda, Joana Leal Freire Quelhas Reis

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (justine.herlemont@neuf.fr, luis.miranda@euvvg.pt, joana.quelhas@euvvg.pt)

RESUMO

A mastite bovina ainda é considerada uma das doenças das explorações mais prevalentes e tem um forte impacto na economia da produção de leite, com perdas diretas e indiretas de até uma média de 240 € por vaca e por ano. A busca de um método de diagnóstico ideal e de um tratamento adequado significa que muitos métodos estão em desenvolvimento ou ainda estão a ser testados. Além disso, com o aumento da antibiorresistência, a utilização de antibióticos, até agora utilizados para tratamento, mas também como medida preventiva, está a tornar-se cada vez mais controlada e sujeita à prova de uma necessidade real. Neste estudo, métodos de diagnóstico e tratamento foram estudados, como novas abordagens, incluindo o mastatest[®], uma ferramenta diagnóstica inovadora para a deteção de mastite clínica em bovinos. O objetivo deste estudo foi compreender o funcionamento do mastatest[®], compará-lo com métodos usuais de deteção de mastite e explorar suas limitações e perspectivas como ferramenta inovadora. Para isso, três artigos foram estudados para avaliar a capacidade do mastatest na deteção de agentes patogénicos, para determinar a sensibilidade e especificidade dele e também para avaliar a sua eficácia quando se trata de mastite subclínica. Como este método é recente, poucos artigos foram encontrados nas bases de dados bibliográficas. Estes estudos e suas análises estatísticas não revelam evidências de inferioridade do mastatest[®] em termos de sensibilidade ou especificidade em relação às técnicas convencionais, os valores encontrados têm uma sensibilidade de 94,6 % e uma especificidade de 72,1 %. No entanto, esta ferramenta tem limitações que foram identificadas como ser pouco fiável na deteção de amostras contaminadas e de coliformes. Ele também tem a incapacidade de detetar microrganismos não bacterianos e tem restrições no uso com leite de pequenos ruminantes. Apesar dessas limitações, o mastatest representa uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e tratamento preciso da mastite clínica em bovinos, sua acessibilidade e facilidade de uso o tornam uma opção prática para os produtores de leite e os veterinários.

Palavras-chave: *Diagnóstico, mastatest[®], mastite, resistência aos antibióticos, sensibilidade*

ABSTRACT

Bovine mastitis is still considered one of the most prevalent farm diseases and has a strong impact on the economics of milk production, with direct and indirect losses of up to an average of 240 € per cow per year. The search for an optimal diagnostic method and appropriate treatment means that many methods are emerging or are still being tested. In addition, with the increase in antibiotic resistance, the use of antibiotics, used for treatment but also as a preventive measure, is becoming increasingly controlled and subject to proof of a real need. In this study, diagnostic and treatment methods were studied, as well as new approaches, including mastatest[®], an innovative diagnostic tool for the detection of clinical mastitis in cattle. The aim of this study was to understand the functioning of the mastatest[®], to compare it with usual methods of mastitis detection, and to explore its limitations and perspectives as an innovative tool. To this end, three articles were studied to evaluate the ability of the mastatest[®] to detect pathogens, to determine its sensitivity and specificity, and also to evaluate its efficacy when it comes to subclinical mastitis. As this method is recent, few articles were found in the bibliographic databases. These studies and their statistical analyses do not reveal evidence of inferiority of the mastatest[®] in terms of sensitivity or specificity in relation to conventional techniques, the values found were a sensitivity of 94.6% and a specificity of 72.1%. However, this tool has limitations that have been identified as being unreliable in detecting contaminated samples and coliforms. It also has the inability to detect non-bacterial microorganisms and has restrictions on use with milk from small ruminants. Despite these limitations, the mastatest[®] represents a valuable tool for the accurate diagnosis and treatment of clinical mastitis in cattle, its affordability and ease of use make it a practical option for dairy farmers and veterinarians.

Key words: Diagnosis, mastatest[®], mastitis, antibiotic resistance, sensitivity

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das doenças com alta incidência nas explorações leiteiras, resultando em perdas económicas significativas (Heikkilä, 2012, Morales-Ubaldo, 2023, Rollin, 2015). Estima-se que o custo da mastite é em média de 240 euros por vaca e por ano na Holanda, mas este custo varia dependendo do país (Morales-Ubaldo, 2023). Essa perda económica direta é dividida entre custos de diagnósticos, veterinários e de tratamento, entre perdas de leite e leite descartado e entre trabalho suplementar associado à gestão da doença (Heikkilä, 2012, Morales-Ubaldo, 2023). Além disso, há perdas económicas indiretas que representam 71 % das perdas, tais como comprometimento da performance de produção futura de leite, reprodutiva e também abate precoce da vaca (Heikkilä, 2012 e Rollin, 2015).

Estima-se que nas duas primeiras semanas de lactação, quando uma vaca apresenta mastite, as perdas seriam de 1 até 2,5 kg de leite por dia (Kour, 2023). O desafio para os criadores é, portanto, reduzir os custos gerados pela doença. Para isso, muitos cuidados são colocados em prática como higienização do ambiente e úbere (Cheng, W, 2020), controle de vacas de reposição, mas acima de tudo boa deteção de agentes patogénicos e o tratamento a ser implementado a fim de otimizar a recuperação. Além disso, com o aumento da resistência aos antibióticos, muitas estratégias foram postas em prática, o que já levou a uma redução de 37% em cinco anos na utilização de antibióticos na pecuária (DGAV, 2017). Embora uma grande parte dos antibióticos utilizados sejam para a glândula mamária, o Regulamento (UE) 2019/6 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de dezembro de 2018, relativo aos medicamentos veterinários, refere que os antibióticos não devem ser utilizados para fins profiláticos e que só devem ser prescritos após a realização de um teste de suscetibilidade aos antibióticos (Regulamento UE2019/6). Foi para abordar essas questões que o mastatest[®] foi desenvolvido.

O objetivo deste estudo é compreender como funciona o mastatest[®], compará-lo com os métodos usuais de deteção de mastite e compreender as limitações e perspetivas desta ferramenta inovadora.

2 MASTITES BOVINAS

2.1 DEFINIÇÃO E PATOGÊNESE

A mastite bovina é uma inflamação do tecido da glândula mamária que pode ser causada por trauma físico ou por microrganismos (Cheng, 2020). A fim de evitar esta contaminação por microrganismos, a glândula mamária tem meios mecânicos de proteção, como o epitélio escamoso, queratina, tecido conjuntivo elástico do esfíncter, mas também meios químicos com lactoferrina, lactoperoxidase e ácidos gordos livres que têm propriedades bacteriostáticas e antimicrobianas (Boutet, 2006). Para além destas defesas inespecíficas, existem defesas específicas como a imunidade humoral, IgG, IgA e IgM, bem como imunidade celular, com macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Boutet, 2006). No caso de uma infeção, as bactérias entram através do teto, viajam até a cisterna e difundem-se nas células. Após algumas horas, penetram no epitélio e dispersam por via sanguínea. Ao ativar o sistema imunológico do hospedeiro, os leucócitos iniciam a resposta inflamatória e destroem os patógenos. Se a destruição ocorre rapidamente, o hospedeiro não apresenta o estado clínico da doença. A resposta inflamatória leva à liberação de substâncias quimiotáticas que permitirão o recrutamento de neutrófilos e outros leucócitos (Boutet, 2006). Isto é seguido pela eliminação do patógeno e a regeneração dos tecidos. No entanto, se os leucócitos não forem suficientes para controlar a proliferação de patógenos, isso leva à liberação de fatores solúveis que gerarão inflamação da glândula mamária e da condição clínica do hospedeiro. Em seguida, a imunidade celular e humoral permitirá a opsonização, fagocitose e eliminação de patógenos. Se esses processos não ocorrerem normalmente, o hospedeiro desenvolve sinais clínicos graves, patógenos colonizam outras áreas e podem levar à morte (Boutet, 2006).

No leite, as alterações observadas são o aumento das células somáticas, teor de proteínas, sódio, cloro. Por outro lado, o teor butírico, lactose e caseína, diminuem, tornando o leite inutilizável (Waes, 2020).

2.2 TIPOS DE MASTITES

Existem fatores ambientais e de gestão que se aplicam, como o clima, a alimentação, a densidade animal, o tipo de cama e as condições de higiene. A ordenha também é uma fonte de contaminação, com as mãos dos ordenhadores e os equipamentos de ordenha atuando como um reservatório de bactérias (Cheng, 2020, Descôteaux, 2004, e Kour, 2023). Moscas e doenças periparto também desempenham um papel na incidência da doença, assim como as características da vaca, incluindo a conformação do úbere e ligamento, bem como a fase da produção e número de lactação da vaca (Cheng, 2020 e Kour, 2023). Por exemplo, animais primíparas apresentam maiores perdas com infecções por *S. aureus*, *Klebsiella* spp. e *E.coli*, enquanto que vacas multíparas com maiores perdas associadas a *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *T. pyogenes* e *E. coli* (Kour, 2023). Epidemiologicamente, a prevalência de mastite de rebanho é de 74,7 % em comparação com uma prevalência de 62,6 % ao nível individual e a mastite subclínica tem uma prevalência maior (59,2 %) em comparação com a mastite clínica (3,4 %) (Kour, 2023).

A maioria dos casos de mastite a nível mundial são de origem bacteriana, sendo *S. aureus*, *S.agalactiae*, *E. coli* os mais identificados, mas algumas leveduras e fungos filamentosos e algas oportunistas como a *Prototheca* spp, também podem ser agentes etiológicos (Cheng, 2020, Descôteaux, 2004 e Kour, 2023).

Se a mastite for classificada de acordo com o agente, é feita uma distinção entre mastite contagiosa e mastite ambiental (Tabela 1). Entre os agentes ambientais, encontramos principalmente a família de *Enterobacteriaceae*, em particular *E. coli*, enquanto que os agentes contagiosos são representados em grande parte por *S. aureus* e *S. agalactiae*. As infecções por *Mycoplasma* e *Corynebacterium* são menos frequentemente diagnosticadas (Cheng, 2020, Descôteaux, 2004, Kour, 2023 e Morales-Ubaldo, 2023). Para mastites subclínicas, *S. aureus*, outras bactérias do género *Staphylococcus*, e *Streptococcus* spp. são os patógenos mais implicados. No entanto, um estudo da Nova Zelândia descobriu que *Corynebacterium* spp (40 %) e *S. aureus* (32 %) foram as bactérias mais comuns para mastites subclínicas (Kour, S. et al., 2023). A prevalência de agentes patogénicos varia de acordo com a posição geográfica, pelo que é um fator a ter em conta na interpretação de um diagnóstico (Kour, 2023).

Tabela 1: Classificação das mastites de acordo com o agente etiológico (Cheng, 2020, Descôteaux, 2004, e Kour, 2023)

CLASSIFICAÇÃO GRAM	CONTAGIOSA / AMBIENTAL	AGENTE PATOGENICO	DESCRIÇÃO	SUBCLÍNICA / CLÍNICA
Gram positivo	Contagiosa	<i>Staphylococcus aureus</i>	<p><u>Fonte:</u> glândula mamaria</p> <p><u>Transmissão:</u> na ordenha, nas mãos, toalhas</p> <p><u>Efeitos:</u> Danifica o sistema de ductos e faz micro-abcessos na glândula infetada, produtores de biofilmes</p> <p><u>Taxa de cura:</u> 40 % em lactação e 50-70 % na seca</p> <p>→ Resistência na penicilina</p>	Subclínica e clínica
		<i>Streptococcus agalactiae</i>	<p><u>Fonte:</u> glândula mamaria</p> <p><u>Transmissão:</u> na ordenha, nas mãos, toalhas</p> <p><u>Efeitos:</u> Destruição e fibrose do tecido glandular, diminuição da produção e agalaxia nas seguintes lactações</p> <p><u>Taxa de cura:</u> 80 % a 100 % em lactação e na seca</p> <p>→ Sensível aos antibióticos</p>	Subclínica
		<i>Corynebacterium</i>	<p><u>Fonte:</u> pele da glândula mamaria</p> <p><u>Transmissão:</u> na ordenha, nas mãos, toalhas</p> <p><u>Efeito:</u> coloniza o canal do teto, diminuição da produção</p>	Subclínica e clínica
	Ambiental	<i>Streptococcus uberis</i> e <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<p><u>Fonte:</u> fezes, camas, chão e água contaminadas, palha</p> <p><u>Transmissão:</u> no contato com o ambiente contaminado entre ordenha, períodos de risco elevado são 2-3 semanas antes da seca e peri-parto</p> <p><u>Efeitos:</u> manifestações locais na glândula</p> <p><u>Taxa de cura:</u> 50-85 % em lactação e 70-100 % na seca</p> <p>→ Fraca resposta aos antibióticos</p>	Clínica
		<i>Staphylococcus não aureus</i>	<p><u>Fonte:</u> pele da glândula mamaria e no ambiente</p> <p><u>Transmissão:</u> no contato com o ambiente contaminado entre ordenha, ou durante a ordenha, período de risco na primeira lactação e pós-parto</p>	Subclínica e clínica
Gram negativo	Ambiental	<i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella spp.</i>	<p><u>Fonte:</u> fezes, camas, chão e água contaminadas</p> <p><u>Transmissão:</u> no contato com o ambiente contaminado entre ordenha, períodos de risco elevado são 2-3 semanas antes da seca e peri-parto</p> <p><u>Efeitos:</u> manifestações locais na glândula</p> <p><u>Taxa de cura:</u> frequente cura espontânea, exceto se mastite severa neste caso a probabilidade de regresso à produção é < 50%</p> <p>→ Sensível aos antibióticos</p>	Clínica
	Contagiosa e Ambiental	<i>Mycoplasma bovis</i>	<p><u>Fonte:</u> mucosa respiratória e urogenital, mas também nas camas, água contaminada.</p> <p><u>Transmissão:</u> aparecimento depois de episódios de estresse</p> <p>Também transmissão com leite contaminado, vacas podem ser portadores assintomáticos</p> <p><u>Efeitos:</u> abscesso com parede fibrosa e fibrose da glândula, edema e dureza do úbere</p> <p>→ Resistência aos antibióticos</p>	Clínica

2.3 SINAIS CLÍNICOS

Dependendo do grau de gravidade, diferentes quadrantes clínicos podem ser observados no hospedeiro (Tabela 2). No grau zero, o animal está saudável, sem sinais clínicos e com leite sem qualquer alteração. No grau seguinte, surge a mastite clínica benigna, que caracteriza-se por leite com anomalias (p.ex: coágulos, descoloração e viscosidade), embora a vaca não apresente qualquer comprometimento do seu estado geral ou mesmo qualquer alteração física no úbere (Kour, 2023). No caso de mastite clínica moderada, o leite está alterado, o úbere é afetado e apresenta sinais de inflamação como calor, aumento de tamanho, dor ao toque, cor anormal. No entanto, a condição geral permanece inalterada (Salat, 2023). Por fim, na mastite clínica grave, o leite está alterado, o úbere está fisicamente também alterado e o estado geral é afetado. A vaca apresenta pirexia (>39,5 °C), anorexia, apatia, desidratação, que podem ir até danos ao sistema musculoesquelético e morte (Descôteaux, 2004, Kour, 2023 e Salat, 2023).

Tabela 2: Sinais clínicos observados em função do grau de mastite (Cheng, 2020, Descôteaux, 2004, Kour, 2023 e Salat, 2023)

	MASTITE CLÍNICA BENIGNA	MASTITE CLÍNICA MODERADA	MASTITE CLÍNICA SEVERA	MASTITE SUBCLÍNICA
ESTADO GERAL	Sem sinais	Sem sinais	Pirexia, anorexia, apatia, desidratação, danos do sistema musculoesquelético e a morte	Sem sinais
UBERE	Sem alterações	Sinais de inflamação (calor, dor, tamanho aumentado, cor anormal)	Sinais de inflamação (calor, dor, tamanho aumentado, cor anormal)	Sem alterações
MODIFICAÇÕES DO LEITE	Coágulos, descoloração, mudança da viscosidade, e aumento das células somáticas	Coágulos, descoloração, mudança da viscosidade, e aumento das células somáticas	Coágulos, descoloração, mudança da viscosidade, e aumento das células somáticas	Macroscopicamente normal Microscopicamente alterado (mudança da composição e aumento das células somáticas)

Outro tipo de mastite, conhecida como subclínica, também é encontrada nas explorações. Apenas um exame laboratorial do leite pode detetar este tipo, uma vez que a vaca não apresenta quaisquer sinais visíveis. O leite é macroscopicamente normal, mas pode-se observar uma mudança na composição (Descôteaux, 2004).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença, da sua severidade e do patógeno em questão deve ser precoce, instantâneo e rápido. Isso é essencial para a implementação adequada do tratamento e do manejo do efetivo no sentido de minimizar as perdas económicas e garantir mais rendimento. Para este efeito, existem várias técnicas de deteção (Kour, 2023).

Os testes convencionais como o teste californiano de mastite (TCM), são qualitativos, rápidos e económicos, mas têm uma menor especificidade (Kour, 2023). As técnicas mais complexas realizadas em laboratório, como a Polymerase Chain reaction (PCR), a espectrometria de massa ou Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF), o teste Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) e outros, permitem a identificação precisa dos agentes envolvidos, mas são mais dispendiosas e necessitam técnicos de laboratório especializadas (Kour, 2023). O diagnóstico por método de cultura bacteriana foi durante muito tempo o padrão para identificar os agentes patogénicos envolvidos na mastite, mas a sua utilização em larga escala exigia métodos padronizados e reprodutíveis (Kour, 2023). Além disso, as técnicas de cultura têm uma sensibilidade limitada e requerem o isolamento de unidades formadoras de colónias (UFC). A recomendação geral para considerar uma amostra de quarto como positiva para uma infeção intramamária (IMI) é utilizar uma concentração de 100 UFC/mL e 200 UFC/mL para *Staphylococcus* que não são *S.aureus*. O desenvolvimento recente de técnicas de diagnóstico baseadas na PCR emerge como o novo padrão, pois a PCR tem uma sensibilidade e especificidade maior (Kour, 2023).

Nas explorações, os agricultores diagnosticam mastites com base em sinais visuais, como secreções anormais do leite, aparência e consistência anormais da glândula mamária e o estado geral da vaca (Kour, 2023). Uma contagem de células somáticas (CCS) é utilizada para detetar as células somáticas no leite. As células somáticas (CS) são células eucarióticas como células epiteliais e leucócitos (linfócitos, macrófagos e granulócitos) presentes naturalmente na glândula mamária

(Boutet, 2006 e Enger, 2020). Durante uma infeção, o número de CCS aumenta devido à degeneração das células epiteliais e ao aumento de leucócitos para combater os patógenos. A CCS é uma medida da concentração destas células no leite e é usado como uma ferramenta para rastrear vacas leiteiras em lactação para mastite (Enger, B.D., et al., 2020). O número mínimo permitido de CCS no leite para a sua comercialização é de 200.000 células por mililitro (ml) em vacas. As vacas com número superior ao CCS são consideradas como doentes (Sharun, 2021). A medição das células somáticas do leite pode ser feita por microscopia direta, pelo TCM ou por um contador eletrónico automático. A microscopia direta demorada, requerendo equipamento preciso e pessoal qualificado, enquanto a contagem automática, baseada em citometria de fluxo, é rápida, sensível e precisa (Kour, 2023). O TCM, por sua vez, fornece uma medição quantitativa, mas pouco precisa, pois é baseada na observação visual. Quando o CCS é alterado, outros métodos são aplicados para encontrar o patógeno responsável (Kour, 2023).

2.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Os marcadores moleculares são usados para identificar agentes infecciosos, especialmente aqueles difíceis de isolar, como *Mycoplasma* spp. A polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) permite obter resultados rapidamente, mantendo alta sensibilidade e especificidade (Kour., 2023). Muitos kits de teste de RT-PCR (por exemplo, Mastitis 4), que funcionam com base na quantificação do ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano, são comercializados. A precisão desses testes varia de 95 a 98 %, e sua sensibilidade e especificidade variam de 100 % e de 99 a 100 %, respetivamente (Kour, 2023). No entanto, falsos positivos podem ser obtidos com esses testes, devido ao facto da mistura dos leites de vacas doentes com leites de vacas saudáveis. Além disso, a distinção entre bactérias vivas e mortas não pode ser feita pelo PCR. Portanto, é importante correlacionar os resultados com o estado clínico das vacas e com sua história clínica (Kour, 2023).

2.4.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

O método ELISA baseia-se no reconhecimento de um antígeno por meio de um anticorpo específico acoplado a um marcador para observar o resultado. A aplicação do teste ELISA indireto para deteção de infeção por *Mycoplasma* em amostras de leite colhidas em explorações já foi realizada. Da mesma forma, citocinas, como fatores de necrose tumoral e interleucinas, proteínas de fase aguda, como a

haptoglobina, consideradas marcadores importantes para a identificação de mastite em bovinos, puderam ser detetadas pelo método ELISA (Kour, 2023).

2.4.3 Métodos baseados em proteómica

Por meio de métodos baseados na proteómica, seria possível diagnosticar rapidamente e com precisão os agentes patogénicos. A espectrometria de massa é usada para identificar moléculas com base em sua relação massa/carga. Várias pesquisas avaliaram o uso da espectrometria de massa MALDI-TOF como uma alternativa para a identificação em larga escala de isolados de bactérias convencionais, não convencionais ou resistentes a antimicrobianos a partir de amostras de leite, em comparação com os protocolos microbiológicos clássicos. Essa nova abordagem ofereceria uma especificidade e sensibilidade aumentadas (Kour, 2023).

Como as mastites possuem uma forte preocupação económica, muitas outras técnicas de diagnóstico estão a ser desenvolvidas com o objetivo de se aproximar o máximo possível de um método de diagnóstico ideal, ou seja, rápido, fácil de usar, sensível e específico, e de baixo custo. Neste estudo, analisaremos as promessas de um novo dispositivo desenvolvido com esse propósito.

2.5 TRATAMENTO

O tratamento da mastite é baseado em estratégias terapêuticas, principalmente antibioterapia. No entanto, no atual contexto de redução da utilização de antibióticos face ao aumento das resistências, novas abordagens para tratar a mastite estão a revelar-se promissoras (Sharun, 2021).

2.5.1 Antibioterapia

Embora os antibióticos ainda sejam frequentemente administrados como medida preventiva, eles continuam a ser o tratamento preferencial para mastite clínica leve a severa, dependendo do agente envolvido. No caso de mastite severa, o tratamento deve ser administrado imediatamente para evitar choque endotóxico (Salat, 2022). Mas no caso de mastite leve, recomendável detetar o agente para direcionar o tratamento. Se o agente em questão for *E.coli*, a recuperação é espontânea em 70 % a 90 % dos casos, evitando a antibioterapia e, assim, reduzindo os custos associados. Por outro lado, para outros coliformes e em particular para a *Klebsiella*, a não utilização de antibióticos leva a um risco de

progressão para cronicidade estimado em 50 %, o que justifica a utilização de antibióticos (Salat, 2022, Ruegg, 2017). Para outros patógenos, o teste de suscetibilidade é recomendado para maximizar a taxa de sucesso do tratamento usando antibióticos aos quais o patógeno é suscetível. A benzilpenicilina e a oxitetraciclina são os antibióticos com maior resistência associada, com 56,3 % e 46,2 %, respetivamente (Sharun, 2021). Além do antibiótico, a adição de anti-inflamatórios não esteroides leva a uma melhoria nos resultados graças ao efeito na resposta inflamatória, permitindo assim uma diminuição das células somáticas e uma redução das perdas de produção de leite (Sharun, 2021).

Geralmente, os antibióticos são administrados por via intramamária para que uma maior concentração de antibiótico atinja o úbere, onde o patógeno está localizado. Durante a infeção grave, a via sistémica é utilizada e pode ser utilizada em combinação com a via intramamária para aumentar a concentração de antimicrobianos no leite e nos tecidos mamários, limitando o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a intensidade da resposta inflamatória e a libertação de endotoxinas (Sharun, 2021).

No caso da mastite subclínica, nenhum antibiótico mostra eficácia na lactação, após a internalização de certas bactérias nas células mamárias. Recomenda-se secar a vaca para aplicar o tratamento (Salat, 2022). Um estudo de Salat O. *et al.* (2008), defende o uso de penetamato hidroide (PH), um antibiótico da classe das penicilinas, mencionando uma diminuição das células somáticas e da percentagem de glândulas infetadas após o tratamento. No entanto, o efeito é menor em animais idosos e naqueles infetados com *S. aureus* resistente à penicilina (Sharun, 2021).

S. aureus é o agente mais difícil de erradicar nos efetivos, é sensível aos antibióticos *in vitro*, mas devido à sua biologia e capacidade de adaptação ao hospedeiro, *in vivo* tem a capacidade de formar biofilmes e microabscessos, tornando alguns antibióticos ineficazes (Sharun, 2021). Além disso, devido ao uso excessivo de antibióticos, alguns *S. aureus* tornaram-se multirresistentes e tornam a antibioterapia ineficaz. Por esta razão, muitos outros tratamentos estão a ser desenvolvidos e estudados (Sharun, 2021).

2.5.2 Bacteriófagos e suas endolisinas

Bacteriófagos, vírus com a capacidade de infetar e matar bactérias, estão a ser estudados *in vitro* para eliminar bactérias formadoras de biofilme. No entanto, isso não foi colocado em prática, devido à falta de estabilidade ambiental e ao armazenamento rigoroso exigido (Sharun, 2021). Além disso,

os bacteriófagos induzem uma resposta humoral do hospedeiro, que então produzirá defesas contra esses vírus e impedirá sua ação contra bactérias (Sharun, 2021).

In vitro, as endolisinas derivadas de bacteriófagos demonstraram eficácia contra bactérias Gram positivas. Estas são proteínas que permitem que o bacteriófago destrua a parede peptidoglicana das bactérias para que possa sair dela após a multiplicação. Estudos sugerem que a adição destas endolisinas ao produto de desinfecção do teto pode prevenir a colonização por bactérias, particularmente bactérias formadoras de biofilme (Sharun, 2021).

2.5.3 Probióticos e peptídeos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos são produzidos por organismos multicelulares, como defensinas e catelicidinas, ou por organismos unicelulares, como bacteriocinas. Eles desempenham um papel na imunidade inata ou permitem a supressão de espécies competitivas, respetivamente (Sharun, 2021). As mais conhecidas são a nisina e a bovicina HC5, bacteriocinas que atuam contra os agentes responsáveis pela mastite. No entanto, a meia-vida curta, o alto custo de produção, a degradação enzimática, os efeitos citotóxicos e o aumento da resistência para eles são parâmetros que impedem o potencial uso de péptidos antimicrobianos contra mastite (Sharun, 2021).

No caso dos probióticos, microrganismos exógenos introduzidos, eles são usados como proteção contra a mastite, especialmente durante o período seco. Utilizadas como suplementos alimentares, injeções intramamárias ou como solução na qual o teto será imerso (Sharun, 2021), as bactérias lácticas *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL 1655 e *L. perolens* CRL 1724, aderindo às células epiteliais do úbere, formarão um biofilme e impedirão o crescimento de patógenos da mastite (Sharun, 2021 e Cheng, 2020).

2.5.4 Fitoterapia

As plantas são conhecidas por terem vários efeitos benéficos em caso de infeção. Algumas têm atividade analgésica que é considerada comparável à do ibuprofeno, atividade anti-inflamatória e antioxidante para reduzir a inflamação do úbere foi demonstrada com extrato de moringa. Outras até têm atividade antibiótica, como o extrato de acetato de etilo da planta *Terminalia chebula*. Estudos *in vitro* também são realizados, com a decocção de *Oxytropis glabra*, com objetivo de inibir a formação de biofilme (Sharun, 2021).

A fitoterapia pode ser administrada topicamente, por via oral e também por via intramamária. Não tem efeitos secundários associados e é menos dispendioso do que um tratamento com antibióticos, embora seja menos eficaz. Usado em combinação com antibioterapia, a fitoterapia fornece melhores resultados do que uma terapia isolada (Sharun, 2021).

Alguns estudos mostraram que preparações como PHYTO-MAST®, contendo timol, salicato de metilo, glicirrizina e a-pineno, são reconhecidas pela Food and Drug Administration (FDA) como seguras (Sharun, 2021). Estas preparações são conhecidas por terem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas e antissépticas, benéficas no tratamento da mastite. No entanto, outros estudos não encontram esses resultados, tornando este método de tratamento pouco comum (Sharun, 2021).

2.5.5 Imunoterapia

Este método de tratamento alternativo baseia-se na utilização de microesferas que transportam anticorpos específicos contra os agentes patogénicos responsáveis pela mastite. Estes anticorpos são combinados com um ativador de fagocitose, o complexo Y, para aumentar a eficácia. Imunoestimulantes, como o extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou a interleucina-2 (IL-2) também podem ser administrados e têm o efeito de aumentar os marcadores do leite, fortalecendo assim a resistência do úbere aos patógenos. No entanto, efeitos abortivos têm sido observados com o uso de IL-2 (Sharun, 2021).

2.5.6 Nanopartículas

As nanopartículas, tais como lipossomas, nanogéis, nanopartículas poliméricas e inorgânicas, bem como nanopartículas lipídicas sólidas estão a emergir como um método alternativo promissor para a administração de antibióticos, a nanopartícula atua como transportador, ou de outras substâncias no tratamento da mastite, visando eficazmente as bactérias multirresistentes (Sharun, 2021 e Kour, 2023). Por exemplo, foi demonstrado que o uso de mel acoplado a nanopartículas de ouro tende a ter atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina ou vancomicina. No entanto, ainda são necessários mais estudos para avaliar os efeitos adversos, *in vivo*, desta tecnologia na biologia do hospedeiro (Sharun, 2021 e Kour, 2023).

2.5.7 Fatores de secreção nativos

A lactoferrina é uma proteína do soro de leite que ocorre naturalmente e tem atividades antibacterianas e anti-inflamatórias resultantes da sua capacidade de se ligar ao ferro. Ao fazê-lo, inibe o crescimento bacteriano, mas a sua ação fica fraca. No entanto, potencia a atividade de certos antibióticos em até 16 vezes no caso de estirpes resistentes à penicilina, inibindo a ação da beta lactamase de transcrever genes bacterianos (*Sharun, 2021*).

Outros métodos de tratamento estão disponíveis ou ainda estão a ser estudados, mas deve-se levar em conta que o tratamento da mastite não deve ser muito caro, a fim de maximizar a rentabilidade, e que não deve ser muito complexo ou exigir meios especiais, o que poderia impedir sua implementação na exploração ou simplesmente sua aquisição por médicos veterinários.

2.6 PREVENÇÃO E GESTÃO DAS MASTITES

Em vez de tratar infecções existentes, prevenir o aparecimento da mastite reduz as perdas económicas. Assim, métodos de manejo eficazes são essenciais para prevenir as mastites (*Sharun, 2021*). O aparecimento da mastite ambiental é prevenido com uma boa higiene ambiental. Isso envolve desinfetar as instalações, camas, o chão, evitar água estagnada e a presença de vetores. Foi demonstrado que um aumento nos níveis de humidade ou poluição no ambiente da exploração, aumenta a carga de agentes patogénicos bacterianos (*Sharun, 2021*). Quando se trata de prevenir a mastite contagiosa, na maioria das vezes transmite-se na sala de ordenha. Por conseguinte, é necessário aplicar boas práticas de higiene. A desinfecção das mãos, toalhas, bem como uma boa desinfecção do equipamento de ordenha que atua como reservatório de bactérias, devem ser cuidadosamente aplicadas (*Sharun, 2021*). A desinfecção dos tetos pré e pós ordenha, usando ácido glicólico ou desinfetantes à base de iodo demonstrou ser segura e eficaz (*Sharun, 2021*). Além disso, o manejo do parto, bem como a restrição da alimentação dos vitelos com leite de mastite são medidas que devem ser implementadas (*Abb-Schwedler, 2014*).

A vacinação pode ser uma ferramenta na prevenção das mastites, mas ainda é controversa. Alguns estudos afirmam que a proteção fornecida não é suficiente, além de ser dispendiosa (*Sharun, 2021* e *Kour, 2023*). Outros estudos acreditam que a vacinação pode ser uma vantagem se for direcionada contra a mastite coliforme, a fim de reduzir o número de casos e a gravidade dos sinais clínicos. Verificou-se uma incidência cinco vezes menor de mastite em vacas vacinadas em comparação

com vacas controle (Descôteaux, 2004). A vacinação não permite prevenir novas infecções intramamárias, mas reduziria os novos casos de mastite clínica para 20 % em vacas com novas infecções intra-mamaria (NIIM) nas vacinadas em comparação com 67 % para vacas não vacinadas com NIIM no início da lactação (Descôteaux, 2004).

Além disso, os criadores devem ter em considerações fatores como a nutrição e a genética das vacas para prevenir surtos de mastites. Também, o uso de selantes de teto e de pulso acústico são medidas que permite ajudar na gestão da doença no rebanho. O uso de antibiótico no período seco parece também ser uma boa forma de prevenção para novos surtos de mastites, mas como já mencionado, o uso de antibiótico deve ser justificado para evitar o aumento das resistências (Sharun, 2021).

2.6.1 Seleção genética

Os criadores podem implementar métodos de manejo para prevenir casos de mastite no efetivo, tais como, selecionar vacas com base na genética pode ajudar a diminuir o risco de mastite. Vacas com úberes baixos, ligamentos fracos ou falta de fixação, demonstraram contrair mais mastite. Assim, preocupações com a genética pode ajudar na saúde do úbere (Sharun, 2021).

O estudo de Sharun *et al.* (2021) demonstra que a expressão de certos genes desempenha um papel na inflamação, resposta imune e mastite. Certos fatores de transcrição, PP53, SP1, e certas proteínas quinases específicas, MAPK1, MAPK14, AKT1, aumentam a expressão desses genes, enquanto outras proteínas quinases, MAPK3, MAPK8, MAPK14l, uma proteína extracelular, MMP-2, e uma proteína mitocondrial, BCL-2, diminuem a expressão desses genes. Estudar a presença ou ausência dessas proteínas e genes no genoma de uma vaca poderia tornar possível selecionar aquele com a combinação limitando o aparecimento da mastite. Finalmente, em algumas vacas rusticas, de raças autóctones, a região codificadora do gene da β -defensina foi identificada como uma ferramenta para selecionar vacas menos susceptíveis à mastite (Sharun, 2021).

2.6.2 Nutrição

Alguns alimentos demonstram possuir propriedades antioxidantes, o que ajuda a resposta imune durante infecções. Minerais e vitaminas usados em suplementos ajudam a manter a saúde do úbere, reduzindo a incidência de mastite crônica em vacas com CCS alto (Sharun, 2021). Por exemplo, a vitamina D tem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, por isso, quando administrada

por via intramamária, diminuirá o número de bactérias presentes no úbere. As vacas que receberam uma administração de selenato de bário e uma dieta de selênio todos os dias antes do parto ou durante a lactação não desenvolveram mastite clínica durante o primeiro mês de lactação. Além disso, a suplementação com selênio e vitamina E causa um aumento na resistência à mastite devido ao aumento do número de neutrófilos a-tocoferol durante o período que envolve o parto (*Sharun, 2021*).

Vacas em balanço energético negativo têm maior probabilidade de desenvolver cetose, duplicando a probabilidade de desenvolver mastite clínica. Um estudo mostra que, no caso da mastite por *E.coli*, a suplementação de cobre pode reduzir a gravidade, as contagens bacterianas e CCS, embora a duração da infecção não seja alterada (*Sharun, 2021*).

2.6.3 Terapia durante o período de secagem

Para tratar a mastite, os antibióticos podem ser usados durante o período de lactação ou durante a secagem. No entanto, o tratamento na lactação é pouco utilizado devido ao alto custo e, especialmente, sua baixa eficácia. A terapia com vacas secas ajuda a eliminar infecções intramamárias existentes e a controlar novas infecções (*Sharun, 2021*). De facto, o tratamento durante a secagem permite maiores taxas de cura, devido à ausência de diluição produzida pelo leite, o que permite uma boa eficácia do antibiótico. O tratamento de vacas durante o período seco reduz a ocorrência de novas infecções intramamárias, que são mais prováveis de ocorrer durante o período seco do que durante a lactação. Um estudo demonstrou que nenhum caso de mastite clínica foi relatado durante o período seco quando o tratamento foi aplicado em comparação com um grupo não tratado, no qual muitos casos de mastite foram observados depois o parto (*Sharun, 2021*). O limiar recomendado para o tratamento de vacas durante o período seco é de 100.000 células/mL para vacas primíparas e 200.000 células/mL para vacas múltíparas. O uso de ciprofloxacina como antibiótico com selante interno de teto como protocolo de secagem demonstrou ser eficaz, uma vez que foi observada uma redução de 24 % no risco global de NIIM (*Sharun, 2021*).

2.6.4 Selante de teto

Fisiologicamente, o canal do teto abre-se antes do parto, permitindo a contaminação por patógenos. O risco de infecção pode ser reduzido usando um produto impermeável durante o período pré-parto.

O selante interno de teto (SIT) pode ser usado em combinação com o tratamento antibiótico para reduzir a incidência de infeções do úbere e para melhorar a prevenção de mastite subclínica (Sharun, 2021). Por exemplo, uma bactéria láctica que tem propriedades probióticas, *Weissella cibaria*, é usado na composição de um selante biológico por ter demonstrado atividade antimicrobiana eficaz contra *S. aureus* e *S. agalactiae*. Outro exemplo é o uso de subnitrato de bismuto e clorexidina na de formulação de SIT com fim de reduzir a incidência de novas infeções intramamárias em vacas adultas e novilhas nulíparas. O resultado obtido com essa formulação foi uma diminuição de 65 % na prevalência de infeções intramamárias pós-parto (IMI), uma redução de 74 % no risco de IMI e uma redução de 70 % no risco de novas infeções por *S. uberis*. Em vista desses resultados, os SIT podem ser considerados uma ferramenta útil para o manejo da mastite em novilhas durante o período perinatal de alto risco (Sharun, 2021).

As medidas preventivas são tão importantes quanto o tratamento das infeções já existentes. Uma abordagem multifacetada, incluindo manejo adequado e nutrição, entre outros, é essencial para prevenir e controlar a mastite em efetivos leiteiros. Acrescentado a um diagnóstico assertivo e uma implementação de tratamento dos doentes, tudo isso permite diminuir os custos associados a doença.

3. O MASTATEST®

3.1 MODO DE FUNCIONAMENTO

O mastatest® (figura 1) é um equipamento bacteriológico, fácil de utilização, que pode ser usado na pecuária. Este dispositivo automatizado permite identificar as bactérias causadora de mastite e oferecer um teste de suscetibilidade aos antibióticos baseado no leite da mastite clínica. Foi desenvolvido pela empresa Mastaplex®, fundada em 2018 em Dunedin. Em agosto de 2023, o laboratório Vêtoquino® obteve o contrato de distribuição na Europa. França foi o primeiro país-piloto, seguida em breve pela Bélgica, Itália e Países Baixos (*Communiqué de presse de Lure du 1^{er} aout 2023*). Em França, existem cerca de 150 analisadores em clínicas e 30 nas explorações. O seu custo ronda os 2500 € por dispositivo, e depois aproximadamente 17 € por cassete, em comparação com 35€ por cassete e análises na clínica (*Vetoquino®*, 2024).



Figura 1: O mastatest® na direita e a cassette de teste na frente (Mastatest®, 2024)

A cassette de análise, que deve ser mantida no frigorífico antes da sua utilização, e é composta por 24 poços, divididos em três linhas (figura 2). Os primeiros seis poços são os poços que contêm os reagentes que geram uma reação colorimétrica enzimática e, assim, permitem determinar o patógeno em questão. Os restantes 18 poços são os que contêm as diferentes concentrações dos três antibióticos, penicilina, cloxacilina e tilosina, cada um numa coluna respetiva. As concentrações variam de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L a 4 mg/L. Se a bactéria cresce, a turbidez do poço fica alterada e o dispositivo será capaz de dar uma concentração inibitória mínima (CIM) (Salat, 2022 e Bates, 2020).

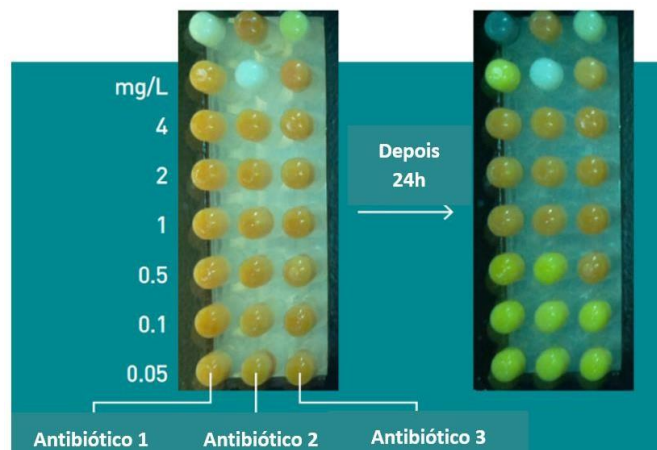


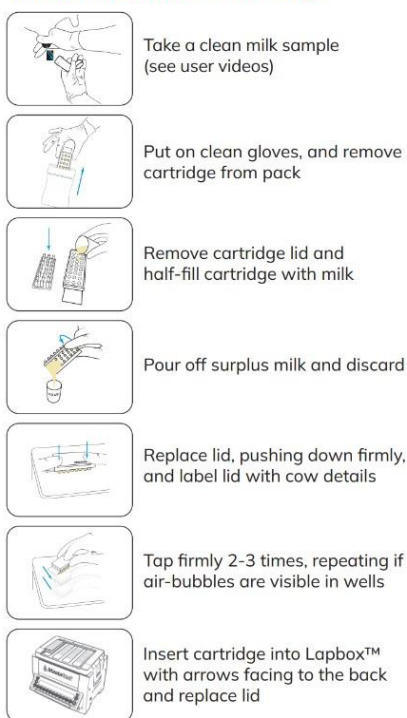
Figura 2: A cassette de análise antes (esquerda) e depois (direita) das 24 horas, com a repartição nos poços (Salat, 2022). Os seis poços em cima são os que contem os reativos para a análise bacteriológica e os 18 poços em baixos são para os diferentes antibióticos com concentrações decrescentes

O analisador deve ser ligado a uma plataforma informática e conectado à rede elétrica. Depois, serão tiradas fotografias repetidas do tanque, contendo a cassete e água a uma temperatura de 37 °C para permitir o crescimento bacteriano (*Salat, 2022 e Bates, 2020 e Mastatest[®], 2024*). As imagens dos poços serão interpretadas por um algoritmo. As reações enzimáticas colorimétricas dos primeiros seis poços serão analisadas e, de acordo com o código de cores obtido, permitirá determinar a presença e a natureza da(s) bactéria(s). Da mesma forma, o crescimento de bactérias nos 18 poços restantes será diferenciado graças à turbidez e as fotos serão analisadas de forma a fornecer um CIM e sensibilidade para cada um dos três antibióticos testados (*Salat, 2022 e Bates, 2020 e Mastatest[®], 2024*).

3.2 MODO DE UTILIZAÇÃO

Quando o criador ou veterinário quer analisar o leite de uma vaca suscetível de ter mastite, ele deve primeiro colher o leite do quarto infetado (figura 3), evitando ao máximo a contaminação por bactérias ambientais ou aquelas presentes no canal do teto. Para que o mastatest[®] analise a amostra, é necessário um mínimo de quatro mililitros de leite, colhidos num tubo estéril e seco. Uma vez recolhido o leite, o criador ou veterinário irá deitá-lo na cassete e certificar-se de que os 24 poços estão bem cheios, para que os reagentes estejam em contacto com o leite a analisar. O excesso de leite deve ser removido (figura 3) para que, quando a tampa estiver ligada, o leite não saia e acabe no tanque do analisador. Em seguida, o operador coloca a cassete no tanque e inicia o programa de análise, a fim de obter os resultados da análise bacteriológica e do CIM em no máximo 24 horas. No final da análise, a cassete pode ser descartada num recipiente adequado (*instruções do fabricante Mastatest[®], 2024*).

Fill a Mastatest® cartridge



Start a Mastatest®

To Begin:

- From the Lapbox main menu, select *Start Mastatest*
- Select Lapbox position used: If first free position used , or scroll to select and

Option 1: BoxStart

- Select cartridge type:
 - For single (1-test) cartridge, *Clinical*
 - For twin (2-test) cartridge, *HISCC*
- Select *BoxStart*
- Input cow number (e.g. 00123) and scroll to select quarter
- Confirm start

Option 2: QuickStart

- Select cartridge type:
 - For single (1-test) cartridge *QuickCM*
 - For twin (2-test) cartridge *QuickSCC*
- Input test details to mastatestsystem.com within 21 hours

Next steps:

- Countdown timer shows the remaining time
- Results emailed within 24 hours
- Further tests can be started independently



Figura 3: Instruções do fabricante para o uso do mastatest® (Mastatest®, 2024).

Na parte esquerda, instruções para encher a cassete com o leite colhido e na parte direita, instruções para iniciar uma análise no aparelho.

3.3 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO DISPOSITIVO

Este dispositivo traz muitas vantagens e é um novo método rápido e eficaz de diagnóstico para o tratamento adequado da mastite clínica. Responde aos desafios atuais do problema da resistência aos antibióticos, dos resíduos de antibióticos no leite comercializado, bem como às questões económicas relacionadas com o setor leiteiro (VetoquinoI®, 2024 e Mastatest®, 2024).

No entanto, o dispositivo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, não permite a identificação de microrganismos que não sejam bacterianos. Leveduras e fungos filamentosos, que podem causar mastite, não são detetados (VetoquinoI®, 2024). Em caso de contaminação multipla, o dispositivo torna-se menos eficiente para a identificação e não pode fornecer o CIM. Isto é devido ao funcionamento do dispositivo, que é baseado em análise colorimétrica e turbidez (Salat, 2022). Além disso, apenas três antibióticos são testados para CIM e só para os Gram positivos. Os resultados do CIM do Gram negativos serão, portanto, revelados como resistentes para todos (VetoquinoI®, 2024). Em segundo lugar, o mastatest® não funciona com leite de pequenos ruminantes. Isto deve-se à diferença de pH entre o leite de ovelha/cabra e o leite de bovino. Esta diferença no pH, que é mais ácido em pequenos ruminantes, não causa a mesma reação colorimétrica na cassete e não são encontrados

resultados (*histórico do dispositivo mastatest® da clínica Eurolia*). Finalmente, o mastatest® permite a detecção de patógenos no caso de mastite clínica, mas não para mastite subclínica, pois o inóculo bacteriano não é suficiente para o algoritmo. No entanto, observamos, num estudo de Saila, S. et al. (2023), a comparação do mastatest® para a detecção de mastite subclínica com o método de cultura em ágar. Isto é possível com cassetes especiais concebidas para a detecção de mastite subclínica, mas estas ainda não se encontram no mercado. De acordo com o laboratório responsável pela distribuição na Europa, deverá ser comercializado durante o ano 2024 (*Vetoquinol®, 2024*).

4. COMPARAÇÃO DO DISPOSITIVO COM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAIS

O mastatest® é uma ferramenta fácil de usar, rápida e económica, mas será que esta nova técnica de diagnóstico é tão eficaz como os métodos de detecção habituais? Para este efeito, estudos comparativos entre o analisador e determinados métodos foram publicados. No entanto, a falta de um método "padrão" para provar a infeção torna a comparação com os métodos mais complicados.

4.1 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE CULTURA DE GÉIS

O método dos três géis é um método acessível e com um custo acessível existente em clínicas veterinárias. É constituído por um ágar de sangue de ovelha, um meio diferencial altamente nutritivo, que é usado para cultivar bactérias. Pode ser usado para observar bactérias com poder hemolítico completo (β -hemólise) ou parcial (α -hemólise). O crescimento de *Streptococcus* e *Corynebacteria*, por exemplo, pode ser observado neste ambiente. Depois um segundo ágar, de eosina-azul de metileno ou McConkey, é então usado para isolar bactérias Gram negativas (*Bergonier, 2017 e Minnesota Easy® Culture System User's Guide, 2016*). Estas duas placas de ágar contêm lactose permitindo a diferenciação de Gram negativas coliformes ou não coliformes, lactose positiva e lactose negativa, respetivamente. As colónias que fermentam lactose tornarão o pH do meio ácido e este mudará de cor e tornando-se vermelho/rosa (McConkey) ou azul-preto (Eosina-azul de metileno). Isso ajuda a destacar *E.coli*, lactose positivo de forma rápida. As colónias que ficam rosas na eosina-azul de metileno são lactoses positivas, mas de crescimento longo, como a *Klebsiella*, *Salmonella* e a *Shigella*, por exemplo. As lactose negativas, como *Proteus* e *Pseudomonas*, não têm coloração. Finalmente, para Gram positivas, um terceiro ágar é usado, Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) ou ágar ácido nalidíxico e

colistina (ANC), que são antibióticos que inibem Gram negativo, com fim a destacar os *Staphylococcus coagulase* positivo. *Staphylococcus aureus* é caracterizado pela formação de colónias negras (Bergonier, 2017 e Minnesota Easy® Culture System User's Guide, 2016).

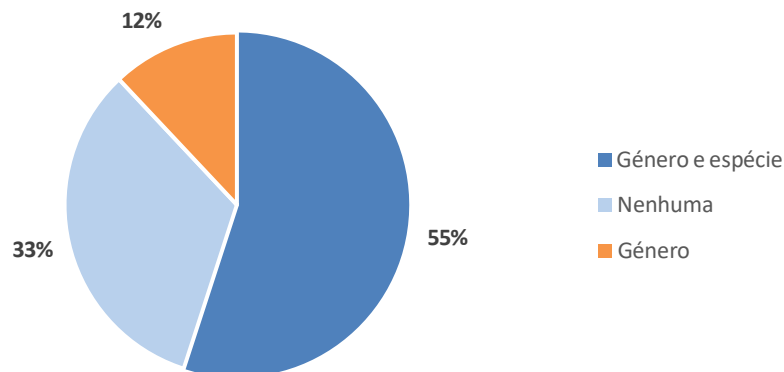
Um estudo realizado por Salat O., Lemaire G. e Chalier M. (2022) numa clínica veterinária em França, comparou a técnica de três placas de ágar com mastatest®. Para isso, foram colhidas amostras de leite em casos de mastite clínica. O teste de suscetibilidade dado pelo mastatest® também foi comparado com o método do disco de acordo com o padrão NF 47-107 (Salat, 2022).

Primeiro, os avaliadores queriam comparar a concordância das duas técnicas para identificar bactérias, ou seja, se eram Gram positivo ou Gram negativo. Os resultados foram resumidos na tabela 3. De 111 culturas puras, a correspondência dos resultados sobre a natureza do Gram é alta (> 90 %). Em seguida, em 37 amostras, eles observaram a correspondência em relação à identificação de coliformes. Eles conseguiram uma correspondência de 86,5 % entre os dois métodos (Salat, 2022). Para a identificação de *Staphylococcus aureus*, em 10 amostras, a correspondência observada foi de 70 %. Finalmente, para *Streptococcus uberis*, 73 % das correspondências foram obtidas em 33 amostras. Obtiveram (gráfico 1), então, 55 % de correspondência entre as duas técnicas para a identificação de género e da espécie, sendo apenas 12 % correspondentes apenas por género, sendo as espécies diferentes. Finalmente, eles obtiveram uma falha de 33 % de correspondência entre as duas técnicas para os patógenos detetados (Salat, 2022).

Tabela 3: Percentagem de correspondência dos resultados entre o mastatest® e o método de cultura de géis (Salat, 2022).

Categorias	Percentagem (%) de correspondência
Gram (n= 111)	90 %
Coliformes (n= 37)	86,5 %
<i>Staphylococcus aureus</i> (n= 10)	70 %
<i>Streptococcus uberis</i> (n= 33)	73 %

Gráfico 1: Gráfico circular relativo à correspondência entre o mastatest® e a técnica de cultura de géis para identificar o género e a espécie, em percentagem (%) (Salat, 2022).



Numa segunda etapa do trabalho, eles compararam se as duas técnicas eram idênticas para a deteção do número de patógenos, analisando 199 amostras. Quando a amostra é estéril ou contém apenas um agente, observam-se resultados idênticos para ambas as técnicas. No entanto, quando mais que um agente está envolvido ou a amostra está contaminada, as técnicas dão resultados diferentes (Salat, 2022). Quando a amostra está contaminada, o mastatest® não é uma técnica muito confiável para detetar essa contaminação, pois de 17 amostras, apenas uma é considerada contaminada pelo analisador, em comparação com 16 para a técnica de ágar. Da igual forma, o analisador dará um resultado de 28 amostras contendo dois agentes, enquanto com a técnica de ágar, apenas 15 amostras serão consideradas como contendo dois agentes. Não é improvável que o analisador não diferencie entre uma amostra contendo dois agentes e uma amostra contaminada devido ao método analítico, que é baseado na interpretação colorimétrica. Por outro lado, a quantidade de leite utilizada para inocular os poços de mastatest® (200 µL) comparativamente com a utilizada para as três placas de ágar (60 µL), aumenta o sucesso de deteção de um patógeno. Relativamente aos resultados do teste de suscetibilidade, o mastatest® relata mais resistência do que o método de disco, mas como as CIM são determinadas no leite, o mastatest® está mais próximo da realidade (Salat, 2022).

Para concluir, o mastatest® possui uma concordância aceitável com o método de ágar com mais de 70% de similaridade para identificação bacteriana. No entanto, para testes de suscetibilidade, o mastatest® sobrestima a resistência, em comparação com o método de ágar.

4.2 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO CROMOGENICO BIPLACAS OU TRIPLACAS

Placas de ágar compartimentadas foram desenvolvidas pela Universidade de Minnesota. As bi-placas têm duas partes, uma com um meio Fator™ permitindo o crescimento de bactérias Gram positivas, e a outra parte com um meio McConkey permitindo a cultura de Gram negativos. A diferença com as placas triplas é a adição de um meio Focus™, permitindo o crescimento de Gram positivos, mais especificamente *Streptococcus* spp. Se os patógenos crescem no meio Fator™, mas não no meio Focus™, o género bacteriano envolvido é *Staphylococcus* spp. Também é possível identificar *Staphylococcus aureus*, que aparece no meio como branco-acinzentado com uma área de hemólise ao redor, embora outros estafilococos não *aureus* também possam ser hemolíticos. Para isso, recomenda-se realizar o teste da coagulase em tubo. Sem testes adicionais, estas placas de ágar não permitem a identificação de *T. pyogenes*, *Corynebacterium* spp ou *Pseudomonas*. A vantagem destas placas é que, para a mesma velocidade e sensibilidade do método de ágar convencional, o custo é menor (Bergonier, 2017 e Minnesota Easy® Culture System User's Guide, 2016).

O estudo conduzido por Jones G. (2017) e sua equipa na Nova Zelândia teve como objetivo comparar a sensibilidade e especificidade do mastatest® com culturas bacterianas tradicionais em laboratório, para identificação de patógenos, usando diretrizes delineadas pelo National Mastitis Council de 2017. Para os testes de suscetibilidade, os resultados de sensibilidade e especificidade do mastatest® são comparados com os resultados determinados de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para isso, colhidas amostras de leite de vacas com mastite clínica, sendo a mastite clínica identificada de acordo com critérios morfológicos do úbere e a aparência do leite. Para o teste de mastatest®, as amostras não são congeladas e são analisadas dentro de uma hora após a colheita (Jones, 2019).

Das 292 amostras analisadas, 256 foram positivas, com a técnica bi/tri-placa, em comparação com 269 amostras positivas com o mastatest® para a deteção de patógenos. Em relação à identificação, ambas as técnicas mostram resultados semelhantes para *S. uberis* e *S. aureus*, uma vez que os outros tipos de patógenos não estão muito presentes na Nova Zelândia (Jones, 2019). A sensibilidade (Se) e a especificidade (Sp) do dispositivo foi comparada com a técnica de cultura padrão. Os resultados revelam um Se e Sp relativamente semelhantes para a identificação de *S. uberis* e *S. aureus*. Por outro lado, tanto para coliformes como para deteção de patógenos, os resultados sugerem que o mastatest® tem uma sensibilidade maior do que a técnica de cultura padrão. No entanto, a baixa presença de

amostras contendo coliformes, bem como a alta especificidade (99 %) tornam a medição insignificante, e o estudo concluiu numa sensibilidade semelhante entre os dois métodos (Jones, 2019).

Para investigar a validade do mastatest[®] para testes de suscetibilidade, 57 isolados de *S. uberis* foram microdiluídos e microplacas de 24 poços foram criadas com as mesmas concentrações de antibióticos do mastatest[®]. Foram utilizadas a benzilpenicilina, cloxacilina e a lincomicina/neomicina (proporção 1:1). Os resultados obtidos foram semelhantes entre o analisador e a técnica utilizada com uma diferença máxima de uma diluição no valor da CIM (Jones, 2019).

A comparação das duas técnicas mostrou que o mastatest[®] não foi menos eficaz do que as técnicas padrões. Este novo método tem a vantagem de não exigir a congelação do leite, pois não há envio de amostras para o laboratório, tornando os resultados obtidos mais fiáveis. De facto, a congelação pode distorcer os resultados, causando a destruição de agentes patogénicos ou causando a lise de células somáticas, o que leva a uma libertação de agentes patogénicos. O tempo de espera pelos resultados também é uma vantagem, pois em 24 horas o analisador dá uma resposta, comparativamente com três a cinco dias para análises laboratoriais. Além disso, os médicos veterinários também recebem os resultados do analisador, permitindo a interpretação profissional dos resultados (Jones, 2019).

As limitações deste estudo são a ausência de um teste de referência e uma possível distribuição enviesada de sensibilidade e especificidade, mascarando assim as diferenças reais entre os dois métodos, uma vez que as placas bi/tri não fornecem uma identificação rigorosa das espécies (Bergonier, D., 2017). No entanto, outros estudos encontraram uma precisão na deteção de Gram positivos de 78 % entre os dois métodos (Jones G., et al., 2019).

Este estudo e sua análise estatística não revelam evidências de inferioridade do mastatest[®] em termos de sensibilidade ou especificidade em relação às técnicas convencionais. Com um Se de 94,6 % e um Sp de 72,1 % obtidos para o analisador em comparação com um Se de 90,5 % e um Sp de 73,9 % para culturas convencionais, os dois métodos de teste mostram tendências semelhantes e estão de acordo (Jones, 2019).

4.3 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE CULTURA DE AGAR E TESTE DE LATEX SEGUIDO DE CONFIRMAÇÃO COM ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF PARA MASTITE SUBCLINICA

Com o objetivo avaliar a fiabilidade do mastatest[®] na deteção do patógeno responsável pela mastite subclínica, para poder adaptar o tratamento de vacas na exploração, a fim de otimizar os custos e o uso de antibióticos, o estudo de Saila, S. *et al.* (2023), comparou o analisador com a cultura de ágar seguida de identificação pelo MALDI-TOF. Foram colhidas amostras de 228 vacas na Nova Zelândia de nove explorações com prevalência clínica e subclínica conhecida de estafilococos (Saila, 2023). As vacas amostradas apresentaram CCS superior a 150.000 células/mL, mas sem sinais clínicos associados. Para análise, as amostras de leite foram descongeladas, agitados com vortice, espalhadas em placas de ágar, incubadas e a presença ou ausência de crescimento bacteriano foi registada. As colónias foram então identificadas usando o teste da catalase para diferenciar o género *Staphylococcus* de *Streptococcus* em Gram positivos, e usando um teste de látex, os positivos para catalase foram testados por aglutinação, com fim de diferenciar estafilococos coagulase positivos, como *S. aureus*, dos SNC (Saila, 2023). Supondo que as colónias positivas para o teste do látex sejam colónias de *S. aureus*, estas são enviadas para o MALDI-TOF para análise. MALDI-TOF é uma técnica para a identificação rápida e precisa de microrganismos usando espectrometria de massa. No caso apresentado, os patógenos serão incorporados numa matriz orgânica e, em seguida, irradiados por um laser Ultravioleta (UV). A ionização de moléculas produz iões carregados e estes são iões que, dependendo da sua massa e carga, demorarão mais ou menos tempo a chegar ao detetor. Calcula-se a relação massa/carga e, em seguida, comparam-se os espectros obtidos com os espectros conhecidos para identificar o microrganismo (Ferreira, 2018).

As amostras de leite foram analisadas em paralelo com o mastatest[®]. A cassette é ligeiramente diferente e apresenta dois conjuntos de 12 poços. O estudo destacou que os dois lados são completamente separados e que não pode haver troca de material biológico. Isto permite ao criador testar duas amostras com apenas uma cassette. O tempo de análise permanece de 24 horas para o analisador. Quando uma amostra era positiva para *S. aureus* e algum SNC, o leite utilizado para este teste foi analisado por ágar e, em seguida, por MALDI-TOF (Saila, 2023).

Os resultados obtidos foram que, para 228 amostras, 45 % continham *S. aureus*. A prevalência é alta, variando de 20% a 84%, mas isso deve-se à escolha de vacas e explorações. A sensibilidade e especificidade obtidas para *S. aureus* é de 90 % com limites de confiança de 95% (Saila, 2023).

Sem teste padrão, as amostras que eram positivas com o analisador e negativas com o método de ágar foram verificadas com MALDI-TOF. Esta verificação revelou que dos 13 positivos obtidos com o analisador, mas negativos com o método de ágar, apenas cinco eram falsos positivos, o que aumenta ainda mais a sensibilidade e especificidade do dispositivo. O estudo também comparou os resultados do analisador quando o leite do quarto infetado foi analisado sozinho ou misturado com leite de outros quartos da mesma vaca. Os resultados mostram que a diluição não impede que o analisador detete a presença de *S. aureus*, com percentagens que variam de 57% quando o leite do quarto infetado é analisado sozinho em vez de 53% quando é misturado. Isso permite que o agricultor economize nos testes, realizando um único teste com o analisador para os quatro quartos da mesma vaca e, assim, adequando seu plano de tratamento (Saila, 2023).

Este estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, o leite analisado é congelado, o que é problemático para os isolados bacterianos, mas a comparação entre os dois métodos não é afetada porque as condições eram as mesmas. Em segundo lugar, o estudo centra-se na presença de *S. aureus*, e as vacas selecionadas encontravam-se em explorações conhecidas por albergarem este agente patogénico. Isso resultou em uma alta prevalência e, embora a sensibilidade e a especificidade não tenham sido afetadas, outros valores calculados, como valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, foram influenciados. Por conseguinte, não é possível extrapolar estes valores para outra população. Finalmente, o protocolo optou por considerar o crescimento de 10 ou >10 UFC como positivo para outros patógenos além de *S. aureus*, tornando os resultados insuficientes para tirar conclusões (Saila, 2023).

No entanto, as conclusões deste estudo são que o analisador pode identificar a presença de *S. aureus* em uma mistura de leite dos quatro quartos da vaca com mastite subclínica (ou seja, um CCS >150.000 células/mL sem sintomas clínicos). Também pode identificar de forma confiável SCN e vacas sem infeção (<10 UFC/ 10 µL de leite) (Saila, 2023). A rapidez de execução dos testes e a possibilidade de analisar duas amostras por cassete tornam o dispositivo economicamente interessante para os criadores tendo em vista a boa sensibilidade e especificidade obtida.

5. CONCLUSÃO

Foi concluído que a mastite continua a ser um problema atual das explorações leiteiras. As perdas económicas causadas e o aumento de bactérias resistentes estão a levar os investigadores a desenvolver novas técnicas de diagnóstico e tratamento, com o objetivo de serem mais eficientes.

Diferentes agentes etiológicos são responsáveis e transmitidos por diferentes meios. O grau de severidade da mastite também difere, tornando o diagnóstico de mastite e seu tratamento mais adequado.

O mastatest® faz parte de novas abordagens diagnósticas, permitindo identificar o gênero e a espécie de bactérias envolvidas, bem como propor um antibiograma direcionado. Este novo método rápido, económico e fácil de utilizar, permite precisão no tratamento e, portanto, melhor eficácia e redução no uso de antibióticos (*Mastatest®*, 2024). O objetivo deste estudo foi comparar o mastatest® com outras técnicas diagnósticas para avaliar sua eficácia. Verificou-se que o mastatest® tem Se de 94,6% e Sp de 72,1% (*Jones, 2017*), tornando-o tão confiável quanto as técnicas de cultura de ágar. A sua eficácia no fornecimento de CIM válidas também foi testada e o mastatest® está de acordo com as técnicas convencionais (*Jones, 2017*). No entanto, sua eficácia na identificação bacteriana de amostras poli contaminadas não foi conclusiva, e o dispositivo permanece limitado em seu uso em outras espécies, que não a bovina (*Salat, 2022*). O pequeno número de artigos encontrados comparando o mastatest® com outras técnicas convencionais pode enviesar as conclusões. De fato, o mastatest® foi comparado a técnicas de cultura de ágar, mas não foi comparado a técnicas mais sensíveis, como a PCR. Da mesma forma, para tornar os resultados mais representativos, mais amostras poderiam ser analisadas. Do ponto de vista do médico veterinário, este dispositivo é uma ajuda, mas o facto de os criadores poderem comprar esta ferramenta, a um custo acessível, para além de ser fácil de utilizar, torna a sua utilização em clínica pouco frequente. Ao longo de dois meses, apenas cinco testes foram realizados ao pedido do médico veterinário. Os agricultores, em vez de viajarem ou pagarem a viagem do médico veterinário, fazem os testes na exploração. À medida que os resultados são enviados para o veterinário, o criador receberá aconselhamento e uma prescrição do antibiótico necessário, evitando assim o custo da análise. Este dispositivo parece, portanto, mais adequado para explorações do que para clínicas veterinárias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abb-Schwedler, K., Maeschli, A., Boss, R., Graber, H.U., Steiner, A., and Klocke, P. (2014) Feeding mastitis milk to organic dairy calves: effect on health and performance during suckling and on udder health at first calving, *BMC Vet Res* 10, 267 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0267-7>
- Bates, A., Richard Laven, R., Bork, O., Hay, M., McDowell, J., Saldias, B. (2020) Selective and deferred treatment of clinical mastitis in seven New Zealand dairy herds, doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104915>
- Bergonier, D. (2017) Le diagnostic bactériologique des mammites bovines, partie 2 : diagnostic bactériologique au cabinet vétérinaire, PathobetOnline, Zoetis, <https://www.pathobetonline.fr/>
- Boutet, P., Bureau, F., Lekeux, P. (2006) La mammite bovine : de l'initiation à la résolution, Formation continue - articles de synthèse, 150, 1-26, https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/8054/1/BoutetPh_AnnMedVet_2006.pdf
- Cheng, WN., Han, S.G. (2020) Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review, doi: 10.5713/ajas.20.0156.
- Communiqué de presse de Lure du 1^{er} août 2023, Mastaplex et Vetoquinol annoncent un accord de distribution, <https://www.vetoquinol.com/fr/publication/5849/view>
- Descôteaux, L. (2004), La mammite clinique : stratégie d'intervention, symposium sur les bovins laitiers, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, https://www.agrireseau.net/bovinslaitiers/documents/Descoteaux_Luc.pdf
- Direction Générale de l'alimentation (2017), Ecoantibio 2 : plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire, <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>
- El-Sayed, A., Kamel, M. (2021), Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. doi: 10.1007/s11250-021-02680-9
- Enger, B.D., Nickerson, S.C., Akers, R.M., Moraes, L.E., Crutchfield, C.E. (2020) Use of commercial somatic cell counters to quantify somatic cells in non-lactating bovine mammary gland secretions. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104775.
- Ferreira, J.C., Gomes, M.S., Bonsaglia, E.C.R., Canisso, I.F., Garrett, E.F., Stewart, J.L., Zhou, Z., Lima, F.S. (2018) Comparative analysis of four commercial on-farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194211>

- Heikkilä, A.M., Nousiainen, J.I., Pyörälä, S. (2012) Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling, *J. Dairy Sci.* 95 :139–150, doi:10.3168/jds.2011-4321
- Jones, G., Bork, O., Ferguson, S.A., Bates, A. (2019), Comparison of an on-farm point-of-care diagnostic with conventional culture in analysing bovine mastitis samples, *Journal of Dairy Research* 86, 222–225, <https://doi.org/10.1017/S0022029919000177>
- Kour, S., Sharma, N., Balaji, N., Kumar, P., Singh Soodan, J., Dos Santos, M.V., Son, Y. (2023) Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis, <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449>
- Mastatest[®] (2024), <https://www.mastatest.com/>
- Minnesota Easy[®] Culture System User’s Guide (2016) Regents of the University of Minnesota, <https://vdl.umn.edu/laboratories/laboratory-udder-health-luh/minnesota-easyr-culture>
- Morales-Ubaldo, A.L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., Zaragoza-Bastida, A. (2023) Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches, doi: 10.1016/j.vas.2023.100306.
- Règlement UE 2019/6 du parlement européen et du conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE, Document 32019R0006, PE/45/2018/REV/1, EUR-Lex, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:32019R0006>
- Rollin, E., Dhuyvetter, K.C., Overton, M.W. (2015) The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool, doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.006.
- Ruegg, P.L. (2017) A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Saila, S., Bork, O., Tucker, I.G., Cranefield, S., Bryan, M.A. (2023) Evaluation of an on-farm culture system for the detection of subclinical mastitis pathogens in dairy cattle, *JDS Communications*, <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0312>
- Salat, O., Sérieys, F., Poutrel, B., Durel, L., Goby, L. (2008) Systemic Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows with Penethamate Hydriodide *Journal of Dairy Science*, doi:10.3168/jds.2007-0174
- Salat, O., (2022) Antibiothérapie des infections mammaires à coliformes, *Journée Nationales GTV – Nantes*, <https://www2.sngtv.org/article-bulletin/antibiotherapie-des-infections-mammaires-a-coliformes/>

- Salat, O., Lemaire, G., Chalier, M. (2022) Un nouvel outil automatisé pour l'analyse bactériologique de lait : mastatest, étude de concordance des résultats avec une techniques classique sur géloses, Journées des GTV, <https://www.vetoquinol.fr/produits/mastatest>
- Salat, O., Lemaire, G., Durel, L., Perrot, F. (2023) Etiology of severe mastitis in French dairy herds. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295614>
- Sharun, K., Dhama K., Tiwari, R., Gugjoo, M.B., Yattoo, M.I., Patel, K.S., Pathak, M., Karthik, K., Khurana S.K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Pal Singh, K., Chaicumpa, W. (2021) Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review, doi: 10.1080/01652176.2021.1882713
- Vetoquinol®, 2024, Ensemble : Atteignons la bonne cible, MAST556/0424, Laboratório de saúde animal, <https://www.vetoquinol.fr/produits/mastatest>.
- Waes, G., Van Belleghem, M. (2020) Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait*, 1969, 49 (485_486), pp.266-290, <https://hal.science/hal-00928493/document>