



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Implementação de um sistema *On Farm Culture* em explorações de bovinos
leiteiros da ilha Terceira - Resultados preliminares**

Margarida Mendes Santos Cascão

Coimbra, julho 2020



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Implementação de um sistema *On Farm Culture* em explorações de bovinos leiteiros da Ilha Terceira - Resultados preliminares

Coimbra, 23 de julho de 2020

Margarida Mendes Santos Cascão

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Prof. Doutora Liliana Montezinho

Arguente: Prof. Doutor Ricardo Bexiga

Orientador: Prof. Doutora Anabela Almeida

Orientador Interno

Prof. Doutora Anabela Almeida

Coorientador Interno

Dr. Mário Silveira (UNICOL)

Orientadores Externos

Dr. João Fagundes (UNICOL)

Dr. Nuno Prates (Hospital Veterinário
Muralha de Évora)

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

ÍNDICE

Resumo	2
Abstract	3
Materiais e Métodos	6
Amostragem	6
Procedimento de colheita e de cultura da amostra de leite	7
Interpretação da cultura realizada pelo <i>OFC by ZTS</i>.....	8
Análise de dados	12
Resultados	13
Discussão.....	23
Conclusão e considerações finais.....	26
Referências Bibliográficas	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	7
Figura 2.....	8
Figura 3a.....	10
Figura 3b	10
Figura 3c.....	11
Figura 3d	11
Figura 4.....	15
Figura 5.....	16
Figura 6.....	17
Figura 7.....	17

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	9
Tabela 2	13
Tabela 5	18
Tabela 3	19
Tabela 4	20
Tabela 6	22

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOX – amoxicilina com ácido clavulânico
AMP10 – ampicilina 10 µg
AMP2 – ampicilina 2 µg
CEFA – cefalexina
CEFA + CAN – associação de cefalexina com canamicina
CEFO – cefoxitina
CEQ – cefquinoma
CFP – cefoperazona
CFZ – cefazolina
CLIND – clindamicina
CLOX – cloxacilina
DAN – danofloxaxina
ENRO – enrofloxaxina
Entero – Enterococos
ERI – eritromicina
ESP – espiramicina
Estrepto – Estreptococos
GEN – gentamicina
Lacto – Lactococos
LIN – lincomicina
LRV – Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores
NEO – neomicina
NT – Não testado
OFC by ZTS – On Farm Culture by Zoetis
OX – oxacilina
PEN10 – penicilina G
PIP – piperacilina
SCN – *Staphylococcus* coagulase-negativo
SEGALAB – Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar
SGL – SEGALAB
SXT – sulfametoxazol-trimetoprim
TE – tetraciclina
TIL – tilosina
UFC – Unidades formadoras de colónias

IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA *ON FARM CULTURE* EM EXPLORAÇÕES DE BOVINOS LEITEIROS DA ILHA TERCEIRA - RESULTADOS PRELIMINARES

Margarida M. S. Cascão^{a,*}; Marisa A. B. Bernardino^b; Ricardo Cabeças^c; João F. F. da Silva^d; Mário Jorge Fontes da Silveira^d; Anabela M. Almeida^{a,e}

^aCentro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal
(margarida418@hotmail.com; almeida.anabela@gmail.com)

^bZoetis Portugal, Lagoas Park Edifício 10, 2740-271, Porto Salvo, Portugal

^cBiophotonics Lab, Biomedicum Stem Cell Center (BSCC), University of Helsinki, Finland
(jcabecas@gmail.com)

^dUNICOL - Cooperativa Agrícola, CRL - Rua Dr. Aníbal Bettencourt Vinha Brava, Conceição 9700-236 Angra do Heroísmo, Terceira, Açores, Portugal (hawk@sapo.pt; mariosilveira@hotmail.com)

^eCoimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of Coimbra, Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal
(almeida.anabela@gmail.com)

RESUMO

A mastite é a doença com maior impacto económico nas explorações, estando também associada ao uso frequente de antibióticos. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o uso do sistema *On Farm Culture by Zoetis*[®] (*OFC by ZTS*) em explorações de bovinos de aptidão leiteira, localizadas na Ilha Terceira. Este sistema visa auxiliar a tomada de decisão terapêutica, com base na identificação do agente etiológico *in situ*, na própria exploração, restringindo o uso de antibióticos aos casos estritamente necessários e promovendo assim o seu uso racional.

Foram consideradas 85 amostras de leite provenientes de vacas diagnosticadas com mastite clínica, de 5 explorações que aceitaram ser incluídas no estudo, bem como de outras 35 explorações que gentilmente cederam amostras colhidas no âmbito da prática clínica. As amostras foram submetidas ao *OFC by ZTS* e avaliadas em dois laboratórios utilizados como referência. Foi feita a caracterização dos isolados, bem como, do seu perfil de sensibilidade antibiótica.

Das 85 amostras analisadas pelo sistema *OFC by ZTS*, o género *Streptococcus* spp. foi o que obteve maior número de isolados (28,4%). Em relação ao perfil de resistência, destacou-se *Staphylococcus aureus* com as seguintes percentagens de isolados resistentes à cefazolina e cloxacilina, 33% e 27%, respetivamente.

Com base nos resultados obtidos, pode inferir-se que o sistema *OFC by ZTS* apresentou um potencial de redução de utilização de antibióticos no tratamento das mastites clínicas de 48,8%, uma vez que 16,5% das amostras revelaram apenas crescimento de agentes Gram-negativos e 32,3% não revelaram qualquer crescimento bacteriano.

Palavras-chave: mastite; bovinos; resistências antimicrobianas; *On Farm Culture*; antibiograma.

ABSTRACT

Mastitis is considered the one of the most costly disease to dairy cattle farms and the one that implies the highest consumption of antibiotics. The present study had as main objective to evaluate the use of the *On Farm Culture by Zoetis*[®] (*OFC by ZTS*) system in dairy cattle farms located on Terceira island. This system aims to assist in therapeutic decision making, based on the identification of the etiologic agent *in situ*, in the own farm, restricting the use of antibiotics to the strictly necessary cases.

This study analysed a total of 85 milk samples from cows diagnosed with clinical mastitis, from 5 farms that agreed to be included in the study, as well as from 35 other farms that kindly provided samples of clinical practice. The samples were submitted to *OFC by ZTS* and evaluated in two laboratories used as a reference. The isolates were characterized, as well as their antibiotic sensitivity profile.

Of the 85 samples analyzed by *OFC by ZTS*, the genus *Streptococcus* spp. was the one that obtained the highest number of isolates (28,4%). Regarding the resistance profile, *Staphylococcus aureus* stood out with the following percentages of isolates resistant to cefazolin and cloxacillin, 33% and 27%, respectively.

Based on the obtained results, it can be inferred that the microbiological culture system here studied could have the potential to reduce the use of antibiotics in the treatment of clinical mastitis by 48,8%, since 16,5% of the samples revealed only growth of Gram negative agents and 32,3% did not show any bacterial growth.

Keywords: mastitis; cattle; antimicrobial resistance; *On Farm Culture*; antibiogram.

Implementação de um sistema *On Farm Culture* em explorações de bovinos leiteiros da Ilha Terceira - Resultados preliminares

Introdução

A mastite é a inflamação glândula mamária, sendo a presença de microrganismos infecciosos considerada como a etiologia mais frequente. Esta patologia pode classificar-se em subclínica ou clínica, subdividindo-se esta em: 1) ligeira - o único sinal que apresenta é a alteração no leite; 2) moderada - quando o leite apresenta um aspeto anormal e há inflamação da glândula mamária e 3) grave - quando para além das alterações anteriormente descritas, o animal também apresenta sinais clínicos sistémicos (Roberson, 2003; Adkins e Middleton, 2018).

Os agentes causadores de mastite podem ser categorizados em ambientais ou contagiosos, consoante o seu reservatório seja, respetivamente, o ambiente onde os animais se encontram ou a glândula mamária e/ou a pele do teto. Os agentes contagiosos (por ex. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) estão associados a transmissão da infeção entre vacas, normalmente durante a ordenha, por disseminação através da contaminação das mãos do ordenhador e/ou da máquina de ordenha. Os agentes ambientais (por ex. *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*) são agentes oportunistas, com disseminação do ambiente para a cisterna do teto, entre ordenhas. Estão também associados a mastites contraídas durante o período seco, o que justifica a importância de realizar uma terapia de secagem, que pode incluir antibiótico (para cura das infeções existentes, quer sejam de origem ambiental ou contagiosa) e deve incluir a aplicação de selante para a reduzir a probabilidade de ocorrência de novas infeções (Makovec e Ruegg, 2003; Divers e Peek, 2008; Blowey e Edmondson, 2010).

A mastite é uma das doenças com maior impacto económico nas explorações, estando também associada ao uso frequente de antibióticos (Lago *et al.*, 2011). Para além de perdas económicas relacionadas com o descarte de leite, a diminuição da fertilidade (Vasquez *et al.*, 2017) e a redução da produção, que pode exceder os 1000kg de leite numa lactação em vacas de alta produção (Lago *et al.*, 2011), devemos ainda considerar os custos associados aos tratamentos e o risco de transmissão da infeção a outros animais. Adicionalmente, esta doença pode levar, devido a um uso excessivo de antibióticos, ao aparecimento de resistências antimicrobianas (Gomes e Henriques, 2016; Vasquez *et al.*, 2017; Chehabi *et al.*, 2019).

As resistências antimicrobianas constituem um problema grave e emergente em todo mundo, com impacto direto na saúde animal e na saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estas definem-se como “a resistência de um microrganismo a um medicamento antimicrobiano originalmente eficaz no tratamento de infecções por ele causadas” (Amaro, 2019). Atualmente, estima-se que mais de 33.000 pessoas na União Europeia (UE) e 700.000 por ano, em todo mundo, morram devido às resistências antimicrobianas (Madero e Álvarez, 2019).

Segundo um estudo realizado por Pol e Ruegg (2007), a prevenção e/ou tratamento de mastites representa cerca de 80% no uso de antibióticos nas explorações de bovinos de aptidão leiteira. Contudo, mais de metade das mastites consideradas ligeiras ou moderadas parecem não necessitar de terapêutica antibiótica, já que alguns estudos demonstraram que percentagens consideráveis de amostras de leite não evidenciam crescimento bacteriano, ou apresentam crescimento de bactérias Gram-negativas ou de agentes não bacterianos (Makovec e Ruegg, 2003; Roberson, 2003; Barret *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2007; Lago, 2018). No entanto, o tratamento de mastites com envolvimento de agentes Gram-negativos é controverso. Alguns estudos sugerem que, no caso de mastites provocadas por *E.coli*, a abordagem não antibiótica deva ser considerada (Suojala *et al.*, 2013; Ruegg, 2018).

Com o principal objetivo de promover um uso racional dos antibióticos e de sensibilizar os produtores e técnicos das explorações para a temática das resistências antimicrobianas, em virtude da premente necessidade de as travar, o sistema *On Farm Culture by Zoetis*[®] (*OFC by ZTS*) surgiu em Itália, no ano de 2018, e tendo em mente o conceito de “Uma só Saúde”. Este projeto consiste na disponibilização a estes profissionais de todo o material e formação necessários para a realização de culturas microbianas de leite mastítico na própria exploração, com o objetivo de promover a identificação do agente etiológico, e com base nesta informação, fundamentar a decisão terapêutica na abordagem da mastite clínica. Em virtude do tempo necessário para a tomada de conhecimento dos resultados, o envio de amostras de leite mastítico, para isolamento e identificação do agente etiológico em contexto laboratorial, não constitui, por rotina, uma prática integrante na tomada de decisão clínica (Lago, 2018).

O projeto *OFC by ZTS* vem dar resposta a esta problemática, sendo que de uma forma rápida (18 a 24 horas), fácil e prática, o técnico da exploração pode testar a presença (ou ausência) dos principais agentes de mastite. Esta abordagem permite direcionar o tratamento em função do agente etiológico em causa, selecionando os casos que beneficiam de antibioterapia. Através desta prática, a probabilidade de sucesso terapêutico aumenta,

evitam-se perdas de leite, devido ao intervalo de segurança dos antibióticos, e custos acrescidos em tratamentos veterinários que não contribuem para a recuperação do estado de saúde do animal sem que se coloque em causa sua produtividade futura (Lago *et al.*, 2011).

Assim, assumindo que as resistências das bactérias aos antibióticos constituem um problema atual e emergente, com implicações graves em todo mundo, e que o uso restrito e consciente dos antibióticos é, sem dúvida, uma medida essencial para ultrapassar este problema, o presente estudo teve os seguintes objetivos gerais, comuns aos do *OFC by ZTS*: I) Sensibilizar os técnicos das explorações para a temática das resistências antimicrobianas; II) Implementar um sistema de cultura de leite mastítico na exploração a fim de direcionar o tratamento da mastite clínica ao agente etiológico; III) Avaliar a aplicabilidade do sistema *OFC by ZTS*, num contexto de serviço de qualidade de leite e de assistência veterinária como o da UNICOL - Cooperativa Agrícola, CRL (UNICOL); e IV) Promover a redução da utilização de antibióticos no tratamento da mastite clínica através deste sistema de cultura microbiológica na exploração. Para tal, foram considerados os seguintes objetivos específicos, que a seguir se enumeram: 1) Caracterizar os agentes etiológicos obtidos nos casos de mastite clínica nas explorações localizadas na Ilha Terceira; 2) Avaliar o potencial de redução de antibióticos com base na aplicação do sistema *OFC by ZTS*; 3) Comparar os resultados obtidos nas culturas realizadas através do sistema *OFC by ZTS* com os obtidos por dois laboratórios usados como referência e finalmente 4) Caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados.

Materiais e Métodos

Amostragem

O presente estudo envolveu a colheita de 125 amostras de leite mastítico, no período compreendido entre 22 setembro de 2019 e 3 fevereiro de 2020. Do total de amostras, apenas 85 contribuíram para o estudo, em virtude de nas restantes 40 amostras não ser possível obter todos os dados necessários à análise, pelo que foram excluídas da mesma. As 85 amostras incluídas no estudo são provenientes de explorações Terceirenses (Figura 1), 5 que aceitaram participar no estudo, bem como outras 35 que surgiram no âmbito da assistência veterinária da UNICOL, na resposta a casos de mastite clínica. Relativamente às explorações aderentes ao estudo, foram realizados inquéritos aos responsáveis pela exploração para avaliação do tipo de manejo, um dos fatores que pode contribuir para o aparecimento desta doença, e da sua opinião em relação à utilização do *OFC by ZTS*.

Para o presente estudo, consideraram-se todos os animais que apresentavam mastite clínica diagnosticada através de um exame clínico criterioso, que incluiu a anamnese, o exame geral, o exame da glândula mamária, a observação visual do leite pertencente ao(s) quarto(s) afetado(s), e os resultados do cartão de diagnóstico de mastite (Kruuse®), que permite evidenciar a alteração de cor, devida à mudança de pH do leite mastítico.

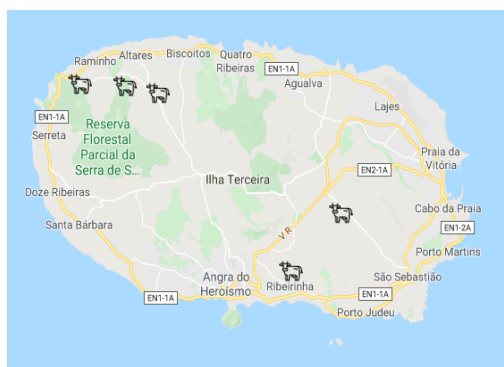


Figura 1. Mapa da Ilha Terceira com a localização geográfica das cinco explorações aderentes (adaptado de: <https://www.google.pt/maps>)

Antes de se iniciar a execução do projeto, foi promovida uma ação de formação aos produtores envolvidos e aos médicos veterinários assistentes, de modo a esclarecer todo o procedimento e sensibilizar para os principais objetivos e vantagens do sistema *OFC by ZTS*. A ação de formação, na sua componente prática, teve como principal objetivo o domínio da técnica analítica pelos intervenientes para que esta fosse, posteriormente, executada autonomamente nas respetivas explorações, com o rigor necessário à obtenção de resultados fidedignos.

Procedimento de colheita e de cultura da amostra de leite

Para a realização do procedimento *OFC by ZTS* foi necessário o seguinte equipamento e reagentes: uma placa (Linearcount3M®) por amostra, com três meios de cultura diferentes - Agar Sangue Columbia CNA, Agar MacConkey e Agar Manitol Sal (Microbiol®), uma estufa (Novital®), uma ansa descartável de dez microlitros, luvas descartáveis, toalhetes desinfetantes (impregnados de álcool a 70% v/v) e frascos estéreis para a colheita da amostra.

As placas encontravam-se armazenadas a temperatura de refrigeração (entre 2 e 8 °C), na posição horizontal, até à sua utilização. A colheita da amostra foi realizada cumprindo todos os requisitos necessários para evitar a contaminação por microrganismos. Todo o procedimento, desde a colheita até à cultura, foi realizado com luvas. Procedeu-se à limpeza dos tetos e desinfeção da sua extremidade distal com o toalhete impregnado de álcool a 70%

v/v. Aquando da recolha da amostra, foram descartados os primeiros 2-3 jatos de leite, e o frasco foi colocado a um ângulo de 45° em relação ao teto e a cerca de 20 cm deste. Após a recolha, o leite foi imediatamente refrigerado e mantido a uma temperatura constante até ao seu processamento.

Com o objetivo de isolar e identificar o(s) agente(s) etiológico(s) presente(s) na amostra, partindo da amostra inicial, realizou-se a cultura com o sistema *OFC by ZTS*, dividindo-a posteriormente em duas alíquotas: 1) a primeira alíquota foi mantida refrigerada e enviada em menos de 24 horas para o Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores (LRV); 2) a segunda alíquota foi submetida a congelação (- 24,5 °C) e à *posteriori* (num prazo máximo de 42 dias) enviada para o Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S.A., no Porto, SEGALAB.

Para a realização do procedimento *OFC by ZTS* (Figura 2), tal como recomendado pelo fabricante das placas, a amostra foi previamente homogeneizada com a ansa estéril (10µl), posteriormente inoculada uma alíquota de leite nos diferentes meios de cultura, fazendo movimentos suaves unidirecionais, em zig-zag, por forma a distribuí-la por toda a placa. Seguidamente, as placas foram devidamente fechadas, identificadas e incubadas em posição invertida, a 37 °C durante 24 horas (+/- 1h). Após esse período procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados.

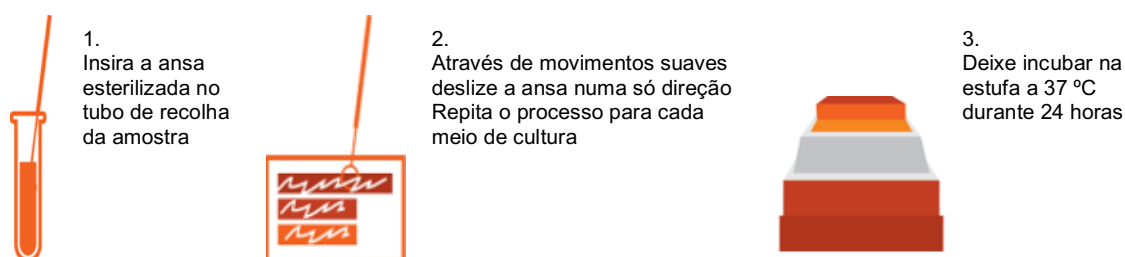


Figura 2. Esquema representativo do procedimento *OFC by ZTS* (Fonte: adaptado do folheto informativo do projeto *OFC by ZTS*, Zoetis Portugal)

Interpretação da cultura realizada pelo *OFC by ZTS*

Após o tempo de incubação, foi feita a interpretação dos resultados, segundo os critérios apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Interpretação de resultados com base no crescimento em diferentes meios de cultura

Interpretação de Resultados						
Agente	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-negativos	Negativo	Contaminação
Agar Sangue Columbia CNA c/ ausência de hemólise	X	X				
Agar Sangue Columbia c/ presença de β-hemólise			X			
Agar MacConkey				X		
Agar Manitol Sal s/ acidificação do meio		X				
Agar Manitol Sal c/ acidificação do meio			X			
Crescimento de UFC com características diferentes						X
Sem crescimento ou < 5 colónias					X	

UFC - Unidades formadoras de colónias (Fonte: adaptado do folheto informativo do projeto *OFC by ZTS*, Zoetis Portugal)

A interpretação dos resultados foi baseada no pressuposto de que cada meio de cultura é seletivo para um grupo de bactérias, de acordo com as suas características. O meio Agar Sangue Columbia CNA promove o crescimento de agentes Gram-positivos (por ex. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ou *Enterococcus* spp.) e inibe o crescimento de agentes Gram-negativos, devido à presença da colistina e do ácido nalidíxico. Já o meio Agar MacConkey é seletivo para Gram-negativos e contém sais biliares que inibem o crescimento de Gram-positivos. O meio Agar Manitol Sal, seletivo para *Staphylococcus* spp., contém vermelho de fenol (como indicador de pH), com o objetivo de detetar a fermentação de manitol pelo agente *Staphylococcus aureus* que altera a cor do meio para amarelo (Tabela 1) (Fonte: adaptado do folheto informativo de Linearcount3M®).

O crescimento de colónias de bactérias apenas no Agar Sangue Columbia CNA, sem ocorrência de hemólise, é indicativo de bactérias do género *Streptococcus* spp. ou *Enterococcus* spp. (exemplo da Figura 3a). Caso ocorra crescimento bacteriano no Agar MacConkey, com fermentação da lactose (colónias de cor fúcsia/rosa forte), este resultado é sugestivo de presença de Gram-negativos (exemplo da Figura 3b). O crescimento no Agar Sangue Columbia CNA e Agar Manitol Sal indica a presença de bactérias do género *Staphylococcus* spp. (exemplo da Figura 3c). Se não ocorrer acidificação por fermentação do manitol é indicativo da presença de *Staphylococcus* coagulase negativo. A presença do agente *Staphylococcus aureus* (exemplo da Figura 3d) provoca uma hemólise tipo β no Agar Sangue Columbia CNA, assim como uma mudança de cor para amarelo do Agar Manitol Sal, resultante da acidificação produzida pela fermentação do manitol por este agente.

É de salientar que quando não ocorre crescimento bacteriano ou este é pouco significativo (até 5 UFC) considera-se um resultado negativo. Por outro lado, quando ocorre crescimento

de UFC com diferentes tamanhos e aspetos (crescimento polimorfológico), nos três meios de cultura, assume-se que a amostra está contaminada (Fonte: adaptado da Literatura do Projeto *OFC by ZTS*, Zoetis Portugal).



Figura 3a. Placa de cultura *OFC by ZTS* com resultado compatível com *Streptococcus* spp. (Gentilmente cedido por: Dr. João Fagundes)



Figura 3b. Placa de cultura *OFC by ZTS* com resultado compatível com Gram-negativos (Gentilmente cedido por: Dr. João Fagundes)



Figura 3c. Placa de cultura OFC by ZTS com resultado compatível com *Staphylococcus* spp. (Fotografia Original)



Figura 3d. Placa de cultura OFC by ZTS com resultado compatível com *Staphylococcus aureus* (Fotografia Original)

Avaliação do perfil de suscetibilidade das bactérias

Os Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) foram realizados nos dois laboratórios intervenientes (LRV, Vinha Brava e SEGALAB, Porto) para avaliação do perfil de suscetibilidade da(s) bactéria(s) isolada(s) em relação aos diferentes antibióticos testados. Os procedimentos foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pela técnica de difusão em disco (Kirby Bauer Modificado) e conforme as normas internacionais CLSI - *Clinical Laboratory Standarts Institute*.

Análise de dados

Após recolha dos dados procedeu-se à sua análise descritiva através do programa Microsoft Excel[®]. Foi analisada a frequência de agentes bacterianos isolados com base nos resultados reportados no âmbito do projeto *OFC by ZTS* e restantes laboratórios, tendo sido feita igualmente a sua categorização em agentes ambientais e contagiosos. Foram comparados os resultados obtidos com *OFC by ZTS* e resultados obtidos pelos dois laboratórios. Com base nos resultados dos antibiogramas foram ainda analisados os principais isolados bacterianos relativamente à sua suscetibilidade aos antimicrobianos.

Os dados obtidos foram sujeitos a análise estatística através do programa *R Core Team*[®] (2019) e foram usados os seguintes testes: coeficiente de correlação de Pearson, teste de *Phi*, coeficiente *Kappa Cohen*, coeficiente de concordância de *Gwet* e o teste de *McNemar*, de forma a tornar a análise estatística mais robusta (Wongpakaran *et al.*, 2013, Gwet, 2018, Feinstein e Cicchetti, 1990).

Procedeu-se à análise de concordâncias de resultados entre os agentes identificados nos três locais de cultura, na exploração, no LRV e na SEGALAB. Foram ainda comparados os perfis das moléculas comuns entre os dois laboratórios usados como referência, para a mesma amostra.

Resultados

Do total de 85 amostras de leite mastítico que contribuíram para este trabalho, 60 foram colhidas no âmbito da prática clínica diária e as restantes 25 amostras foram obtidas a partir das 5 explorações aderentes ao projeto *OFC by ZTS*.

No que respeita à caracterização dos agentes etiológicos identificados nas explorações estudadas os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização geral dos agentes isolados expressa em percentagem (%), de acordo com os resultados obtidos pelo *OFC by ZTS* e nos dois laboratórios utilizados como referência (LRV e SEGALAB)

Agentes	OFC	LRV	SGL
Estreptococos/Enterococos/Lactococos	28,4%	35,3%	34,4%
<i>Streptococcus</i> spp.	-	1,2%	27,9%
<i>Streptococcus uberis</i>	-	29,4%	4,1%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	3,5%	-
<i>Streptococcus ovis</i>	-	-	0,8%
<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	0,8%
<i>Enterococcus faecium</i>	-	1,2%	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	-	-	0,8%
Gram-negativos	19,3%	17,6%	29,5%
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	16,5%	26,2%
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	3,3%
<i>Serratia marcescens</i>	-	1,2%	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5%	11,8%	9,0%
SCN	6,8%	3,5%	6,6%
<i>Staphylococcus</i> spp.	-	-	6,6%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	1,2%	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	1,2%	-
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	1,2%	-
Outros	1,1%	4,7%	9,0%
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	1,2%	-
<i>Kokuria rosea</i>	-	3,5%	-
Leveduras	-	-	9,0%
Contaminação	1,1%	-	-
Sem crescimento	31,8%	27,1%	11,5%
Total	88	85	122

OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores; SGL - SEGALAB; SCN - *Staphylococcus coagulase-negativo*

A Figura 4 apresenta o perfil de resultados obtidos no *OFC by ZTS* relativamente a agentes Gram-negativos e culturas sem crescimento. Com base nestes dados é possível inferir o potencial de redução de antibióticos no tratamento de mastites clínicas através do recurso a este sistema. A categoria “Outros” inclui *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, bem como as amostras contaminadas.

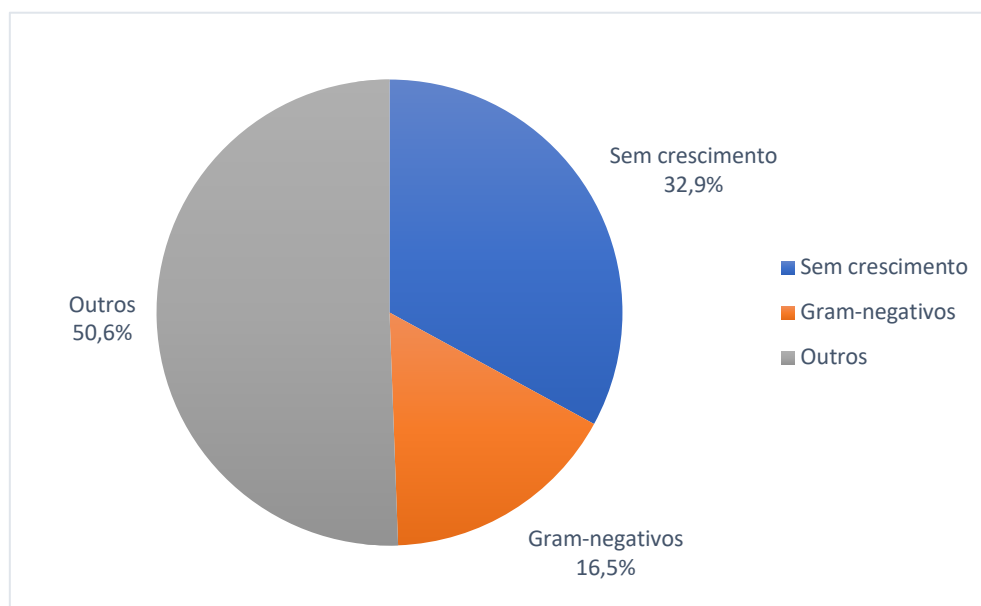


Figura 4. Potencial de redução de antibióticos com base nos resultados obtidos com *OFC by ZTS*: Gram-negativos e Sem crescimento (n= 60 isolados)
Outros - *Streptococcus* spp.; *Staphylococcus* spp.; *Staphylococcus aureus*; Contaminação

A Figura 5 representa a percentagem (%) de agentes contagiosos e ambientais com base nos resultados obtidos nas placas de cultura do *OFC by ZTS* e nos dois laboratórios usados como referência.

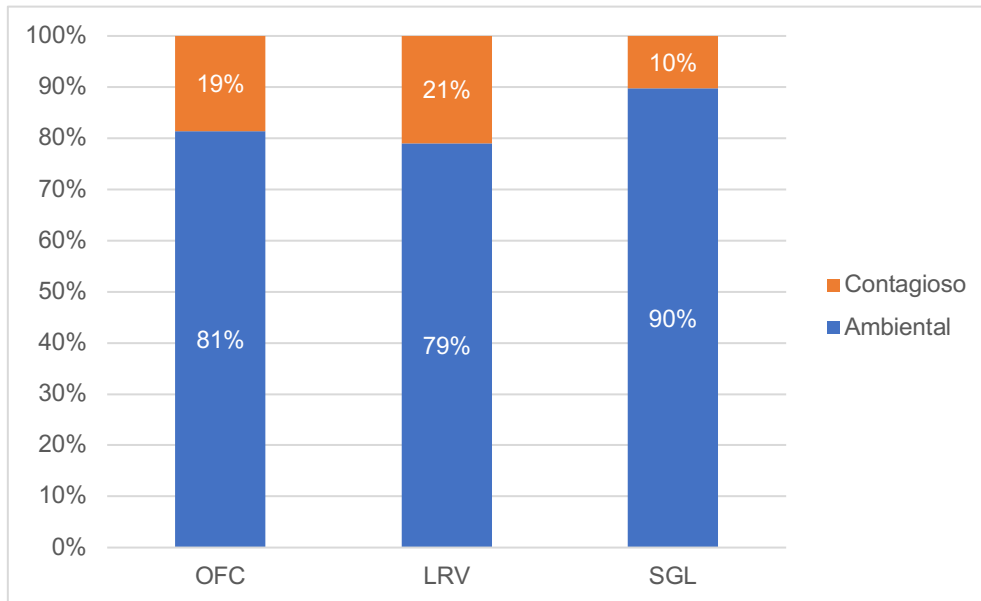


Figura 5. Percentagem (%) de agentes contagiosos e ambientais nas amostras colhidas, no âmbito do *OFC by ZTS* e nos dois laboratórios usados como referência (LRV e SEGALAB)
OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores; SGL - SEGALAB

No que diz respeito à comparação de resultados do *OFC by ZTS* e dos resultados provenientes dos dois laboratórios usados como referência, a frequência dos agentes isolados encontra-se representada na Figura 6. Do total de 85 amostras, não se obteve crescimento bacteriano em 28 amostras através do sistema *OFC by ZTS*, em 23 amostras no LRV e em 14 na SEGALAB (Figura 6).

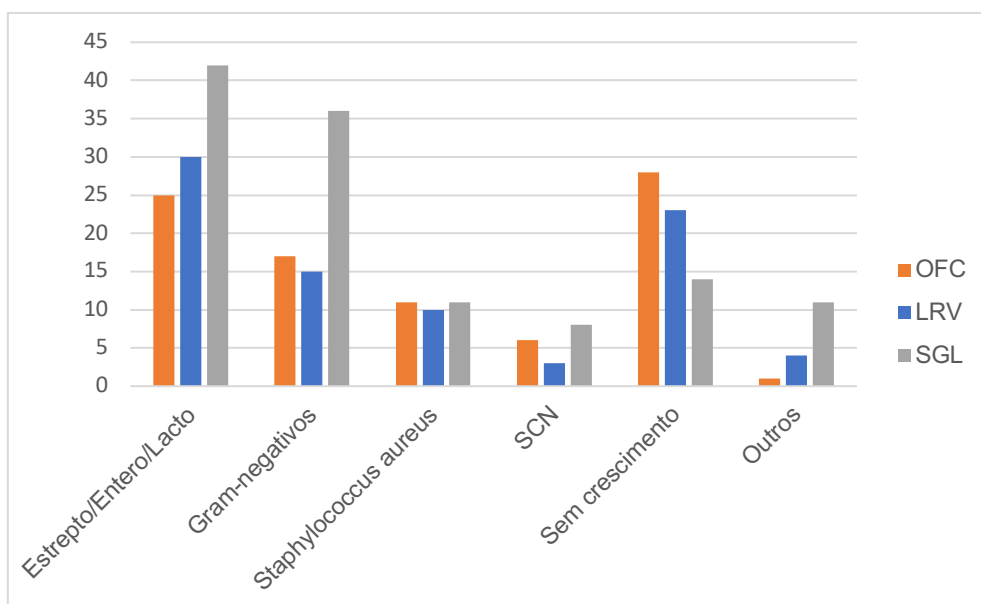


Figura 6. Frequência dos agentes isolados no âmbito do *OFC by ZTS* e dos dois laboratórios usados como referência, LRV e SEGALAB

OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores; SGL - SEGALAB; Estrepto - Estreptococos; Entero - Enterococos; Lacto - Lactococos; SCN - *Staphylococcus* coagulase negativo; Outros - *Corynebacterium* spp.; *Kokuria rosea*; Leveduras; Contaminação

A comparação dos resultados obtidos no sistema *OFC by ZTS*, relativamente aos dois laboratórios usados como referência, avaliada através da similaridade de resultados, encontra-se expressa na Figura 7.

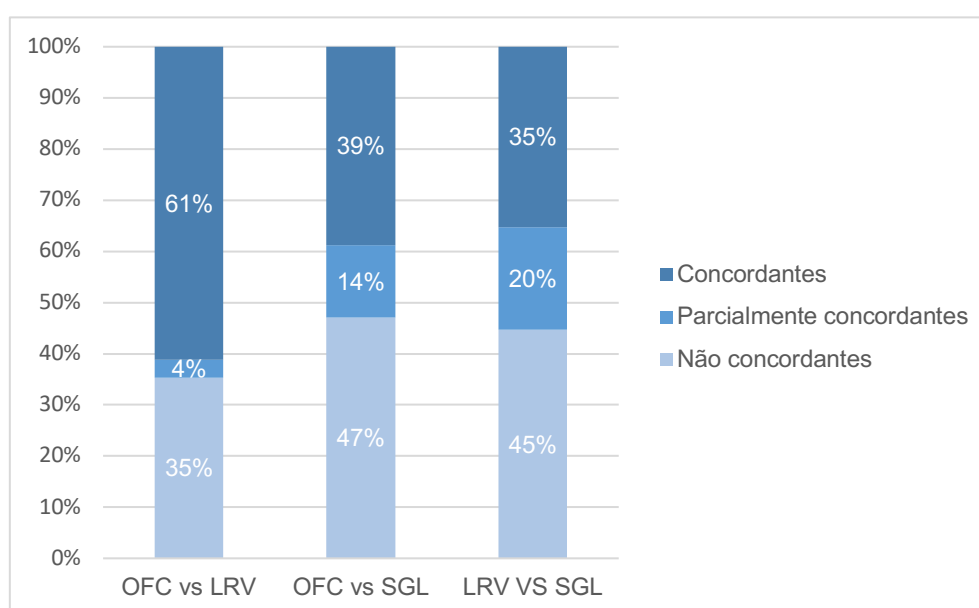


Figura 7. Comparação entre os resultados obtidos no âmbito do *OFC by ZTS* e nos dois laboratórios usados como referência, para avaliação da concordância de resultados entre laboratórios

OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores; SGL - SEGALAB

A análise estatística dos resultados obtidos, acima representados (Figura 7), relativamente à concordância entre *OFC by ZTS* e os dois laboratórios usados como referência, encontra-se expressa na Tabelas 3.

Tabela 3. Concordâncias de resultados relativamente aos agentes isolados no OFC, LRV e SEGALAB

Agentes	Locais cultura	Coeficiente de correlação de Pearson		Teste de Phi	Coeficiente Kappa de Cohen	Coeficiente de concordância de Gwet		Teste de Mcnemar
		Correlação	p-value			Coef	p-value	p-value
Estreptococos/ Enterococos/Lactococos	3 Lab	-	-	-	-	0,436	<0,001	-
	OFC vs LRV	0,388	0,002	0,39	0,38	0,519	<0,001	0,4
	OFC vs SGL	0,343	0,001	0,34	0,31	0,347	0,0015	0,003
	SGL vs LRV	0,452	<0,001	0,45	0,43	0,448	<0,001	0,02
Gram-negativos	3 Lab	-	-	-	-	0,639	<0,001	-
	OFC vs LRV	0,617	<0,001	0,62	0,62	0,831	<0,001	0,8
	OFC vs SGL	0,524	<0,001	0,52	0,46	0,567	<0,001	<0,001
	SGL vs LRV	0,415	<0,001	0,42	0,35	0,493	<0,001	<0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 Lab	-	-	-	-	0,789	<0,001	-
	OFC vs LRV	0,73	<0,001	0,73	0,73	0,925	<0,001	1
	OFC vs SGL	-0,044	0,7	-0,04	-0,044	0,696	<0,001	1
	SGL vs LRV	0,0768	0,5	0,08	0,077	0,745	<0,001	1
SCN	3 Lab	-	-	-	-	0,866	<0,001	-
	OFC vs LRV	0,196	0,07	0,2	0,18	0,908	<0,001	0,4
	OFC vs SGL	0,068	0,5	0,07	0,068	0,834	<0,001	0,8
	SGL vs LRV	-0,061	0,6	-0,06	-0,054	0,853	<0,001	0,2
Sem crescimento	3 Lab	-	-	-	-	0,646	<0,001	-
	OFC vs LRV	0,644	<0,001	0,64	0,64	0,736	<0,001	0,3
	OFC vs SGL	0,364	0,006	0,36	0,33	0,588	<0,001	0,006
	SGL vs LRV	0,301	0,005	0,3	0,29	0,625	<0,001	0,08
Outros	3 Lab	-	-	-	-	0,858	<0,001	-
	OFC vs LRV	-0,024	0,8	-0,02	-0,019	0,938	<0,001	0,4
	OFC vs SGL	-0,042	0,7	-0,04	-0,022	0,838	<0,001	0,009
	SGL vs LRV	-0,085	0,4	-0,09	-0,074	0,79	<0,001	0,1

Estrepto - Estreptococos; Entero - Enterococos; Lacto - Lactococos; SCN - *Staphylococcus coagulase negativo*;
OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores;
SGL - SEGALAB; Outros - *Corynebacterium* spp.; *Kokuria rosea*; Leveduras e Contaminação

As Tabelas 4 e 5 referem-se à percentagem (%) de agentes sensíveis (S), intermédios (I) e resistentes (R) dos isolados bacterianos, em relação às moléculas analisadas, nos dois laboratórios usados como referência.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana obtido através dos resultados do laboratório LRV, expressos em percentagem (%)

	Agentes	Estreptococos/ Enterococos/ Lactococos	Gram- negativos	<i>Staphylococcus aureus</i>	SCN	Outros	Total
	Total	30	15	10	3	4	62
AMP10	S	90%	46%	89%	33%	100%	78%
	I	3%	31%	0%	33%	-	10%
	R	7%	23%	11%	33%	-	12%
Nº isolados testados		30	13	9	3	3	58
AMP2	S	NT	NT	100%	NT	NT	100%
	I	NT	NT	-	NT	NT	-
	R	NT	NT	-	NT	NT	-
Nº isolados testados		0	0	1	0	0	1
CEFO	S	NT	NT	100%	100%	NT	100%
	I	NT	NT	-	-	NT	-
	R	NT	NT	-	-	NT	-
Nº isolados testados		0	0	10	3	0	13
CEQ	S	NT	80%	100%	100%	NT	89%
	I	NT	0%	-	-	NT	0%
	R	NT	20%	-	-	NT	11%
Nº isolados testados		0	15	10	3	0	28
CFP	S	NT	80%	100%	100%	NT	89%
	I	NT	7%	-	-	NT	4%
	R	NT	13%	-	-	NT	7%
Nº isolados testados		0	15	10	3	0	28
CLIND	S	76%	100%	86%	100%	NT	81%
	I	0%	-	14%	-	NT	3%
	R	24%	-	0%	-	NT	17%
Nº isolados testados		25	1	7	3	0	36
CLOX	S	NT	NT	100%	100%	NT	100%
	I	NT	NT	-	-	NT	-
	R	NT	NT	-	-	NT	-
Nº isolados testados		0	0	3	2	0	5
CFZ	S	NT	100%	100%	100%	NT	100%
	I	NT	-	-	-	NT	-
	R	NT	-	-	-	NT	-
Nº isolados testados		0	1	10	3	0	14
ERI	S	86%	-	90%	100%	100%	87%
	I	7%	100%	10%	-	-	9%
	R	7%	-	0%	-	-	4%
Nº isolados testados		29	1	10	2	3	45
GEN	S	NT	92%	100%	100%	NT	96%
	I	NT	8%	-	-	NT	4%
	R	NT	0%	-	-	NT	0%
Nº isolados testados		0	13	10	3	0	26
LIN	S	90%	NT	100%	100%	100%	94%
	I	0%	NT	-	-	-	0%
	R	10%	NT	-	-	-	6%
Nº isolados testados		10	0	3	2	3	18
OX	S	NT	NT	100%	100%	NT	100%
	I	NT	NT	-	-	NT	-
	R	NT	NT	-	-	NT	-
Nº isolados testados		0	0	10	3	0	13
PEN10	S	90%	NT	90%	67%	100%	89%
	I	3%	NT	0%	0%	-	2%
	R	7%	NT	10%	33%	-	9%
Nº isolados testados		30	0	10	3	3	46
SXT	S	100%	80%	100%	100%	100%	95%

	I	-	0%	-	-	-	0%
	R	-	20%	-	-	-	5%
N° isolados testados		29	15	10	3	3	60
TE	S	90%	69%	100%	100%	100%	88%
	I	3%	23%	-	-	-	7%
	R	7%	8%	-	-	-	5%
N° isolados testados		30	13	10	3	3	59

Estrepto - Estreptococos; Entero - Enterococos; Lacto - Lactococos; SCN - *Staphylococcus coagulase* negativo; Outros - *Kokuria rosea*, *Corynebacterium* spp., Leveduras

NT - Não testado; AMP10 - ampicilina 10 µg; AMP2 - ampicilina 2 µg; CEFO - cefoxitina; CEQ - cefquinoma; CFP - cefoperazona; CLIND - clindamicina; CLOX - cloxacilina; CFZ - cefazolina; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - lincomicina; OX - oxacilina; PEN10 - penicilina G; SXT - sulfametoxazol-trimetoprim; TE - tetraciclina

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana obtido através dos resultados do laboratório SEGALAB, expresso em percentagem (%)

		Agentes	Estreptococos/ Enterococos/ Lactococos	Gram- negativos	<i>Staphylococcus aureus</i>	SCN	Total
		Total	42	36	11	8	97
AMOX	S	100%	81%	100%	100%	93%	
	I	-	0%	-	-	0%	
	R	-	19%	-	-	7%	
N° isolados testados		42	36	11	7	96	
AMP	S	100%	NT	NT	NT	100%	
	I	-	NT	NT	NT	-	
	R	-	NT	NT	NT	-	
N° isolados testados		40	0	0	0	40	
CEFA	S	100%	69%	NT	100%	70%	
	I	-	0%	NT	-	0%	
	R	-	31%	NT	-	30%	
N° isolados testados		1	35	0	1	37	
CEFA + CAN	S	100%	NT	90%	100%	95%	
	I	-	NT	0%	-	0%	
	R	-	NT	10%	-	5%	
N° isolados testados		6	0	10	5	21	
CEQ	S	94%	96%	100%	100%	96%	
	I	0%	4%	-	-	1%	
	R	6%	0%	-	-	3%	
N° isolados testados		35	23	3	8	69	
CFP	S	98%	97%	100%	100%	98%	
	I	0%	3%	-	-	1%	
	R	2%	0%	-	-	1%	
N° isolados testados		42	36	11	8	97	
CFZ	S	86%	70%	67%	100%	81%	
	I	0%	0%	0%	-	0%	
	R	14%	30%	33%	-	19%	
N° isolados testados		35	23	3	8	69	
CLOX	S	67%	11%	73%	88%	49%	
	I	12%	0%	0%	0%	5%	
	R	21%	89%	27%	13%	46%	
N° isolados testados		42	35	11	8	96	
DAN	S	79%	94%	91%	100%	88%	
	I	17%	3%	9%	-	9%	
	R	5%	3%	0%	-	3%	

Nº isolados testados		42	36	11	8	97
ENRO	S	97%	94%	82%	100%	94%
	I	3%	3%	9%	-	4%
	R	0%	3%	9%	-	2%
Nº isolados testados		31	33	11	8	83
ESP	S	NT	6%	NT	NT	6%
	I	NT	3%	NT	NT	3%
	R	NT	91%	NT	NT	91%
Nº isolados testados		0	35	0	0	35
GEN	S	100%	97%	73%	100%	93%
	I	-	0%	27%	-	5%
	R	-	3%	0%	-	2%
Nº isolados testados		1	35	11	8	55
LIN	S	89%	NT	NT	NT	89%
	I	3%	NT	NT	NT	3%
	R	9%	NT	NT	NT	9%
Nº isolados testados		35	0	0	0	35
NEO	S	NT	NT	NT	100%	100%
	I	NT	NT	NT	-	-
	R	NT	NT	NT	-	-
Nº isolados testados		0	0	0	1	1
PEN	S	90%	NT	NT	NT	90%
	I	2%	NT	NT	NT	2%
	R	7%	NT	NT	NT	7%
Nº isolados testados		41	0	0	0	41
PIP	S	NT	-	NT	NT	-
	I	NT	-	NT	NT	-
	R	NT	100%	NT	NT	100%
Nº isolados testados		0	1	0	0	1
TIL	S	88%	NT	91%	86%	88%
	I	0%	NT	9%	0%	2%
	R	12%	NT	0%	14%	10%
Nº isolados testados		41	0	11	7	59

Estrepto - Estreptococos, Entero - Enterococos, Lacto - Lactococos; SCN - *Staphylococcus* coagulase-negativo; NT - Não testado; AMOX - amoxicilina com ácido clavulânico; AMP - ampicilina; CEFA - cefalexina; CEFA + CAN - associação de cefalexina com canamicina; CEQ - cefquinoma; CFP - cefoperazona; CFZ - cefazolina; CLOX - cloxacilina; DAN - danofloxaxina; ENRO - enrofloxaxina; ESP - espiramicina; GEN - gentamicina; LIN - Lincomicina; NEO - neomicina; PEN - penicilina; PIP - piperacilina; TIL - tilosina

A análise estatística dos resultados obtidos relativamente à suscetibilidade antimicrobiana dos dois laboratórios usados como referência, no que diz respeito às moléculas comuns (ampicilina, penicilina, lincomicina, cefoperazona, cefquinoma) e agentes do grupo Estreptococos/Lactococos/Enterococos e do grupo de Gram-negativos, encontra-se expressa na Tabelas 6.

Tabela 6. Concordância entre resultados de amostras nos dois grupos de agentes isolados em relação a ampicilina, penicilina, lincomicina, cefoperazona e cefquinoma

Agentes	Molécula	Nº isolados testados	Amostras concordantes (S)		Cohen Kappa	Coeficiente de concordância de Gwet	
						Coef	p-value
Estreptococos/Enterococos /Lactococos	AMP	24	87,50%	21	0	0,87	<0,0001
	PEN	24	83,33%	20	-0,055	0,824	<0,0001
	LIN	24	25%	6	0,05	0,24	0,0642
Gram-negativos	CFP	13	84,62%	11	0	0,838	<0,0001
	CEQ	13	76,92%	10	0,19	0,746	0,0002

Estrepto - Estreptococos; Entero - Enterococos; Lacto - Lactococos; OFC - *On Farm Culture by ZTS*; LRV - Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores; SGL - SEGALAB; AMP - ampicilina; PEN - penicilina; LIN - lincomicina; CFP - cefoperazona; CEQ - cefquinoma

Discussão

Os resultados obtidos através do projeto *OFC by ZTS* indicam que no total de 60 isolados bacterianos, 28,4% pertencem ao grupo Estreptococos/Enterococos/Lactococos, em 28,3% das amostras foram isolados Gram-negativos, e em 18,3% e 10% das amostras foram identificados *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo, respetivamente (Tabela 2).

Uma vez que a decisão terapêutica foi baseada nos resultados obtidos no *OFC by ZTS*, neste estudo foi ainda possível inferir sobre o potencial de redução da utilização de antibióticos no tratamento das mastites clínicas (Figura 4). Este potencial baseou-se nos resultados de culturas onde não ocorreu crescimento bacteriano e nas amostras em que houve crescimento de bactérias Gram-negativas. Nestes casos, as recomendações do *OFC by ZTS*, são para manter a vigilância clínica e administrar apenas um anti-inflamatório não esteroide (AINE). Assim, com base nesta abordagem, das 85 amostras testadas, **32,9%** não apresentaram crescimento bacteriano e em **16,5%** obteve-se um resultado de Gram-negativos, o que sugere um potencial de redução de antibióticos de **49%**. Este valor é semelhante ao obtido por Lago *et al.* (2011) num estudo em que se comparou a utilização de antibióticos em mastites com e sem recurso à identificação do agente por um sistema de cultura na exploração, e em que se verificou uma redução de 56%. Um outro estudo, realizado por Vasquez *et al.* (2017) sugere um potencial de redução de antibióticos de 68,5%, sendo que em 33% das amostras não ocorreu crescimento bacteriano e em 34% das amostras foram isolados agentes Gram-negativos. O potencial de redução dependerá, obviamente, do microbismo da exploração, sendo tanto maior quanto maior for a percentagem de mastites causadas por agentes Gram-negativos ou não bacterianos.

No que diz respeito à possível origem dos agentes isolados, no *OFC by ZTS* a maior percentagem foi ambiental (81%), maioritariamente do género *Streptococcus* spp. e Gram-negativos. Estas percentagens são semelhantes às obtidas no LRV, destacando-se *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Na SEGALAB, a percentagem de agentes ambientais foi de 90%, com predomínio de bactérias do género *Streptococcus* spp. e da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 2 e Figura 5). Quanto aos agentes de provável origem contagiosa, os isolamentos na SEGALAB, *OFC by ZTS* e LRV corresponderam a 10, 19 e 21%, respetivamente (Figura 5), sendo que *Staphylococcus aureus* foi o agente deste grupo com maior representatividade.

Tendo em consideração que o regime nos Açores é predominantemente extensivo, tais resultados não seriam expectáveis. Os fatores que podem justificar este tipo de microbismo não foram avaliados neste estudo, mas a implementação generalizada de medidas preventivas durante a ordenha (uso de luvas e *pós-dipping*) pode ser uma das razões para a baixa percentagem de agentes contagiosos face aos ambientais. Por outro lado, a deficiente higienização da extremidade do teto na preparação para a ordenha pode constituir um dos possíveis fatores para o elevado número de isolamentos de agentes de possível origem ambiental. Outra causa poderá ser o maneio na secagem (correta aplicação de selante e medidas de higiene), que pode conduzir a mastites por agentes ambientais no início da lactação (Hogan e Smith, 2012). Vários estudos demonstram que a utilização de selante de tetos conduz a uma redução das mastites clínicas no início da lactação (Berry e Hillerton, 2007) e esta prática ainda não é adotada por alguns produtores da Ilha Terceira ou poderá haver utilização com técnica incorreta, numa parte dos casos.

No que se refere aos agentes com maior predominância de isolamentos em laboratório, o grupo *Streptococos/Enterococos/Lactococos* foi o que obteve maior expressão, com grande destaque na SEGALAB (42 agentes isolados num total de 108).

Relativamente aos agentes Gram-negativos, verificaram-se resultados similares no *OFC by ZTS* e no LRV, e um número de isolados mais elevado na SEGALAB (Figura 6).

Quanto às culturas onde não se verificou crescimento bacteriano (Figura 6), os resultados são similares entre o *OFC by ZTS* e o LRV (n=28 vs n=23, respetivamente), tendo-se verificado um número mais baixo na SEGALAB (n=14), o que poderá estar associado a fatores relacionados com o transporte/conservação das amostras, neste último caso.

Em relação à comparação dos resultados entre as três abordagens (Figura 7), foi possível observar que 61% dos resultados foram concordantes entre o *OFC by ZTS* e o LRV, 39% entre o *OFC by ZTS* e a SEGALAB e 35% entre os dois laboratórios utilizados como referência. Observou-se, portanto uma maior concordância entre o *OFC by ZTS* e o LRV.

Esta percentagem de resultados concordantes entre o *OFC by ZTS* e o LRV pode justificar-se por diferentes fatores, entre os quais o facto de as culturas serem interpretadas por operadores com distintos níveis de experiência, a contaminações da amostra entre a cultura no *OFC by ZTS* e a do laboratório e à utilização de diferentes provas de identificação, para além da cultura, no LRV. A baixa similaridade entre o *OFC by ZTS* e a SEGALAB, poderá relacionar-se com diferentes fatores a equacionar, designadamente os intervalos de tempo

entre a colheita da amostra e a respetiva análise, a possível oscilação da temperatura de refrigeração durante a conservação e envio das amostras, e ainda as diferenças entre técnicas analíticas. As amostras enviadas para a SEGALAB foram previamente congeladas para posterior envio. Nos resultados obtidos a partir das amostras analisadas pela SEGALAB o número de isolados foi mais elevado. Contudo neste contexto, num estudo realizado por Bexiga *et al.* (2011), não se verificou maior número de isolados associado ao processo de congelação, tendo até havido um decréscimo. Um estudo realizado anteriormente por Schukken *et al.* (1989) sugere que um maior período de tempo de congelação poderá estar associado a um menor número de agentes isolados, exceto no caso de *Staphylococcus* coagulase-negativo. Não obstante, no presente estudo não é possível tirar ilações concretas, em virtude do número reduzido de amostras deste isolado.

Relativamente à análise estatística (Tabelas 3 e 6), foi necessário recorrer a vários testes de forma a tirar conclusões fidedignas sobre a análise de concordância dada a natureza dos dados. O paradoxo de *Kappa* pode impactar os resultados obtidos, causando o risco de tirar considerações erradas sobre a análise de concordância. Quando observado o teste de *Gwet*, os valores de concordância são muito semelhantes aos reais podendo este ser considerado um teste mais robusto (Wongpakaran *et al.*, 2013, *Gwet*, 2018, Feinstein e Cicchetti, 1990).

Ao comparar os três locais de cultura, é possível verificar que a concordância de resultados é variável nos grupos de agentes isolados, sendo *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN), o mais concordante e o grupo *Streptococos/Enterococos/Lactococos*, o que obteve menor concordância.

Quando analisado o *OFC by ZTS* com os dois laboratórios de referência, numa visão geral, verifica-se haver maior concordância entre o LRV, o que confirma os resultados obtidos na Figura 7. Destaca-se o agente *Staphylococcus aureus* como aquele que apresentou maior concordância de resultados no teste de *Gwet*, o que também vem confirmar os resultados obtidos na Figura 7.

Em relação à avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados do LRV é de destacar que 10% dos isolados de *Staphylococcus aureus* e 33% dos SCN apresentam resistência à penicilina G e à ampicilina. Relativamente ao género *Streptococcus* spp., 10% apresentam resistência à lincomicina e 7% à penicilina G, tetraciclina e eritromicina, sendo que 24% dos isolados são resistentes à clindamicina, contudo este antibiótico não está formulado para uso em bovinos, no entanto, é de salientar que foi já identificado um gene de resistência *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) ao qual se atribui resistência cruzada entre macrólidos,

lincosamidas e estreptograminas (Schwarz *et al.*, 2010, Roberts *et al.*, 1999). Estudos anteriores relataram também resistência em *Streptococcus* spp. (Minst *et al.*, 2012; Faublée *et al.*, 2002). A disseminação deste gene *erm* e a possível resistência cruzada são fatores importantes a considerar na abordagem terapêutica de mastites (Werckenthin *et al.*, 2005).

De acordo com o que está descrito, *Staphylococcus* coagulase negativo tende a apresentar mais resistências aos antimicrobianos que *Staphylococcus aureus*, facilmente desenvolvendo multirresistência, sendo que a produção de beta-lactamases, o mecanismo de resistência mais comum nos *Staphylococcus* spp., resulta em resistência à penicilina G e aminopenicilinas (Taponen e Pyorala, 2009; Taponen *et al.*, 2016). No presente estudo, os resultados evidenciam isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo resistentes à penicilina G (33%) e à ampicilina (33%) (Tabela 3), à cloxacilina (13%) e à tilosina (14%) (Tabela 4). Adicionalmente, a percentagem de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina G e (10%) e à ampicilina (10%) foi menor do que a verificada nos isolados e *Staphylococcus* coagulase negativo (Tabela 3).

Relativamente à análise estatística dos antibiogramas, foram comparadas as moléculas comuns nos dois laboratórios de referência. Apenas as amostras representadas na Tabela 6 é que demonstraram concordância de resultados e apenas para resultados onde se obteve sensibilidade (S).

É de referir que existe uma elevada percentagem (%) de concordância da ampicilina (87,5%) no grupo Estreptococos/Enterococos/Lactococos, podendo ser confirmada com o teste de Gwet (0,87), sendo a lincomicina a que obteve menor concordância. Em relação aos Gram-negativos, as concordâncias tanto para a cefoperazona como para a cefquinoma, são significativamente altas.

Conclusão e considerações finais

A implementação do sistema *OFC by ZTS* permitiu atingir um dos principais objetivos no combate às resistências antimicrobianas, que é a sensibilização dos técnicos das explorações. As resistências antimicrobianas constituem um problema grave e um desafio para as futuras gerações. Se não forem tomadas medidas para reduzir o risco de resistência bacterianas, as consequências podem ser dramáticas no âmbito da produção e sanidade animal.

Através da aplicação da *OFC by ZTS* foi também possível, no âmbito da rotina clínica, direcionar o tratamento da mastite clínica ao agente etiológico, e assim promover a redução

da utilização de antibióticos no tratamento da mastite, seguindo as orientações do *OFC by ZTS*. A redução da utilização de antibióticos é atualmente uma das principais abordagens, preconizadas pelas várias entidades reguladoras, para mitigar o risco de disseminação de genes de resistências antimicrobianas.

O presente estudo permitiu ainda caracterizar o perfil de isolados através da análise dos resultados das amostras de leite mastítico. Evidenciou o género *Streptococcus* spp. como um dos isolados mais frequentes nas mastites diagnosticadas nas explorações estudadas da ilha Terceira. Permitiu ainda uma sumária caracterização do perfil de resistência de alguns dos isolados mais problemáticos, tal como *Staphylococcus aureus*, que revelou maior percentagem de resistência à cefazolina e cloxacilina.

A abordagem realizada permitiu também comparar os resultados obtidos nas culturas realizadas através do sistema *OFC by ZTS* com os obtidos por dois laboratórios usados como referência, tendo-se verificado uma percentagem de 61% concordância entre resultados obtidos pelo *OFC by ZTS* e o laboratório de referência regional, validando, assim, os resultados obtidos no *OFC by ZTS*. Finalmente, a aplicabilidade do sistema *OFC by ZTS*, em contexto de assistência veterinária cooperativa, possibilita a identificação dos agentes etiológicos de forma simples, rápida e prática, enquadrando-se na abordagem de rotina às mastites clínicas, e com implicações na redução da utilização dos antibióticos e na rentabilidade das explorações.

Como consideração final devemos enfatizar ainda que devido à pandemia provocada pelo vírus SARS COV-02, o *OFC by ZTS* tornou-se uma ferramenta essencial na deteção de agentes etiológicos de mastite na Ilha Terceira, em virtude da demora na obtenção de resultados ou mesmo a ausência de resposta do LRV face às circunstâncias.

Face à consciencialização crescente dos técnicos e dos proprietários das explorações para a necessidade do uso judicioso dos antibióticos, este sistema de cultura de leite mastítico na exploração deverá, cada vez mais, ser solicitado por produtores que não foram inseridos no projeto inicial.

Espera-se, pois, que a atual abordagem contribua para uma prática clínica guiada pelo uso racional do antibiótico, minimizando o impacto das resistências antimicrobianas e preservando os fármacos para as gerações futuras.

Referências Bibliográficas

- Adkins PRF e Middleton JR (2018). *Methods for Diagnosing Mastitis*.
- Amaro A (2019). Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais da cadeia alimentar 2016–2019.
- Barrett DJ, Doherty ML e Healy AM (2005). Peer reviewed in 12 Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*, 58(1), 31–35.
- Berry EA e Hillerton JE (2002). The effect of an intramammary teat seal on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2512–2520.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74334-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74334-8)
- Bexiga R, Koskinen MT, Holopainen J, Carneiro C, Pereira H, Ellis KA e Vilela CL (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 49–55.
<https://doi.org/10.1017/S0022029910000725>
- Blowey R e Edmondson P (2010). *Mastitis Control in Dairy Herds, 2ª edição*. Editores: Sarah Hulbert e Fiona Harrison. CAB International, 36-38.
- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE e Green MJ (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253–258. <https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253>
- Chehabi CN, Nonnemann B, Astrup LB, Farre M e Pedersen K (2019). *In Vitro Antimicrobial Resistance of Causative Agents to Clinical Mastitis in Danish Dairy Cows*.
- Divers JT e Peek FS (2008). *Diseases of Dairy Cattle*. Teri Merchant. 2ª edição. Saunders Elsevier, 358-365.
- Feinstien, A. R., e Cicchetti, D. V. (1990). High Agreement but Low Kappa. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43(6), 551–585.
- Gomes F e Henriques M (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

- Guérin-Faubleé, V., Tardy, F., Bouveron, C., e Carret, G. (2002). Antimicrobial susceptibility of Streptococcus species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00485-X)
- Gwet, K. L. (2008). Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 61(1), 29–48. <https://doi.org/10.1348/000711006X126600>
- Hogan, J., e Smith, K. L. (2012). Managing Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.009>
- Lago A e Godden SM (2018). *Use of Rapid Culture Systems to Guide Clinical Mastitis Treatment Decisions*.
- Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL e Leslie K (2011). 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. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4441–4456. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4046>
- Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL e Leslie K (2011). *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*.
- Madero CM e Álvarez SS (2019). SAÚDE ANIMAL O futuro da loita contra a resistencia na gandería española: os retos do novo PRAN. *Vaca Pinta*, 98–102.
- Makovec JA e Ruegg PL (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3466–3472. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73951-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-4)
- Minst, K., Märtlbauer, E., Miller, T., e Meyer, C. (2012). Short communication: Streptococcus species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6957–6962. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852>

- Nunes SF, Cavaco LM, Vilela CL e Bexiga R (2007). Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal - Antimicrobial susceptibility traits of subclinical bovine mastitis pathogens in Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102(563–564), 275–280.
http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2007/275-280.pdf
- Pol M e Ruegg PL (2007). Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 249–261. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72626-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72626-7)
- Roberson JR (2003). Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 223–234.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00071-3)
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., e Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 2823–2830.
<https://doi.org/10.1128/aac.43.12.2823>
- Ruegg PL (2018). *5_Making-Antibiotic-Treatment-Decision_2018_Veterinary-Clinics-of-North-America.pdf*.
- Schukken YH, Smit JAH, Grommers FJ, Vandegheer D e Brand A (1989). Effect of Freezing on Bacteriologic Culturing of Mastitis Milk Samples. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1900–1906. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79309-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79309-7)
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van duijkeren, E., Johnson, A. P., e Gaastra, W. (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 601–604.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq037>
- Suojala L, Kaartinen L e Pyörälä S (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 521–531. <https://doi.org/10.1111/jvp.12057>

- Taponen, S., e Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>
- Taponen, S., Nykäsenoja, S., Pohjanvirta, T., Pitkälä, A., & Pyörälä, S. (2016). Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0193-8>
- Vasquez AK, Nydam DV, Capel MB, Eicker S e Virkler PD (2017). Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2992–3003. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-1161>
- Wongpakaran, N., Wongpakaran, T., Wedding, D., e Gwet, K. L. (2013). A comparison of Cohen's Kappa and Gwet's AC1 when calculating inter-rater reliability coefficients: A study conducted with personality disorder samples. *BMC Medical Research Methodology*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-13-61>



ESCOLA
UNIVERSITÁRIA
VASCO DA GAMA



MEDICINA
VETERINÁRIA

REGISTO DE CASUÍSTICA

Nome aluno (a):	Margarida Mendes Santos Cascão
Local (ais) de estágio:	Unicol
Período estágio:	4 / 09 / 19 a 4 / 11 / 19
Breve contextualização do EC:	Observação e auxílio em cirurgias e consultas; preparação e administração de fármacos; realização de exames físicos; palpação retal para diagnóstico de gestação.

Casos clínicos presenciados	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Diarreia			28						
Pneumonia			32						
Colibacilose					4				
Cetose			15						
Hipocalcémia			23						
Parto			10						
Queratoconjuntivite			4						
TOTAL	0	0	112	0	4	0	0	0	0

Cirurgias presenciadas	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Deslocamento de Abomaso			7						
Cesariana			4						
Castração					1				
TOTAL	0	0	11	0	1	0	0	0	0

Intervenções em sanidade e/ou produção animal	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Palpação retal			300						
TOTAL	0	0	300	0	0	0	0	0	0

Ações em Segurança Alimentar e Saúde Pública	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL

TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Necrópsias	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*discriminar em linhas abaixo os casos clínicos observados, subdivididos ou não por especialidades de acordo com o critério do orientador

**nomear e quantificar as cirurgias assistidas nas diferentes espécies

***devem ser incluídas e nomeadas as diferentes ações de profilaxia (ex: intradermotuberculinação, desparasitação, vacinação, colheita de sangue para rastreio sorológico)

****discriminar as ações de segurança alimentar (ex: inspeção carcaças). No caso de ações em que a definição de espécie não seja possível ou aplicável deverão apenas preencher o total na última coluna

OBS: os critérios de definição e apresentação da casuística devem ser discutidos com os orientadores interno e externo, sugerindo-se no entanto a sua apresentação em folha de cálculo ou modelo semelhante; os dados na tabela podem ainda, se a orientação interna e externa, assim o entender, ser trabalhados graficamente, por espécie, especialidade etc...



REGISTO DE CASUÍSTICA

Nome aluno (a):	Margarida Mendes Santos Cascão								
Local (ais) de estágio:	Hospital Veterinário Muralha de Évora								
Período estágio:	9 / 12 / 19 a 28 / 02 / 20								
Breve contextualização do EC:	Observação e auxílio em cirurgias e consultas; observação e auxílio em sanidade animal; realização de exames físicos; limpeza de material								
Casos clínicos presenciados	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Pneumonia			20						
Diarreia			10						
Intoxicação			2						
Hipocalcémia			3						
Parto			12						
Queratoconjuntivite			1						
TOTAL	0	0	48	0	0	0	0	0	0
Cirurgias presenciadas	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Cesarianas									
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intervenções em sanidade e/ou produção animal	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
Intradermotuberculização			500						
TOTAL	0	0	500	0	0	0	0	0	0
Ações em Segurança Alimentar e Saúde Pública	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL

TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrópsias	Caninos	Felinos	Bovinos	Ovinos/ Caprinos	Suínos	Equinos	Aves	Coelhos/ Outros	TOTAL
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*discriminar em linhas abaixo os casos clínicos observados, subdivididos ou não por especialidades de acordo com o critério do orientador									
**nomear e quantificar as cirurgias assistidas nas diferentes espécies									
***devem ser incluídas e nomeadas as diferentes ações de profilaxia (ex: intradermotuberculização, desparasitação, vacinação, colheita de sangue para rastreio sorológico)									
****discriminar as ações de segurança alimentar (ex: inspeção carcaças). No caso de ações em que a definição de espécie não seja possível ou aplicável deverão apenas preencher o total na última coluna									
OBS: os critérios de definição e apresentação da casuística devem ser discutidos com os orientadores interno e externo, sugerindo-se no entanto a sua apresentação em folha de cálculo ou modelo semelhante; os dados na tabela podem ainda, se a orientação interna e externa, assim o entender, ser trabalhados graficamente, por espécie, especialidade etc...									