

# REVISTA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VOLUME XXX

N.º 1 / JANEIRO - JUNHO

2007

**JORNADAS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS MEDITERRÂNEAS (ICAM)**

**“Inovação Tecnológica  
nos Sistemas Agrícolas Mediterrânicos”**

**SOCIEDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE PORTUGAL**

**Fundada em 1903  
Lisboa — Portugal**



## Unidade de estudos de mastites em pequenos ruminantes – estudos em ovinos de regime extensivo

### Small ruminant mastitis unity – studies on grazing ewes

M.C. Queiroga<sup>1</sup>, M.E. Potes<sup>1</sup>, E.M. Duarte<sup>1</sup>, A.A.M. Marinho<sup>1</sup>,  
C.M. Bettencourt<sup>2</sup>, C.A.P. Matos<sup>2</sup>, C.C. Belo<sup>3</sup>, J.M. Ribeiro<sup>3</sup> & C.L. Vilela<sup>4</sup>

#### RESUMO

A “Unidade de Estudo de Mastites em Pequenos Ruminantes”, formalmente constituída no âmbito do Programa Nacional de Re-equipamento Científico, da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, vem dar corpo ao trabalho de colaboração de diversas equipas de investigação que se têm debruçado sobre a problemática das infecções intramamárias em pequenos ruminantes, nos seus aspectos de saúde animal, saúde pública veterinária e qualidade e segurança alimentar. Tem como principal objectivo criar condições para o desenvolvimento de trabalhos de investigação e divulgação científica que contribuam para reduzir a prevalência de mastites em pequenos ruminantes e assim melhorar a produção e a qualidade do leite, favorecendo produtores de leite, produtores de queijo e consumidores.

Entre os trabalhos já realizados pela equipa científica, destacam-se o isolamento e identificação de agentes etiológicos de mastite em ovelhas, o estudo de factores de virulência nas bactérias mais relevantes, o

estudo dos mecanismos de infecção e a resposta imunológica local e sistémica do hospedeiro e outros estudos na área da epidemiologia.

O estudo da etiologia e da fisiopatologia da mastite ovina, com o objectivo de compreender a modulação da resposta imunitária da glândula mamária, poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos de controlo com base na estimulação da resposta imunitária, alternativos ao uso de antibióticos.

#### ABSTRACT

The “Small Ruminant Mastitis Unit”, formally constituted in the scope of the Programa Nacional de Re-equipamento Científico, Science and Technology Foundation, gathers the collaborative work of several research groups that have been addressing the issue of small ruminants intramammary infections, related to animal health, veterinary public health and food safety and quality. Its main purpose is to generate an adequate environment for re-

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, e-mail: [crique@uevora.pt](mailto:crique@uevora.pt); <sup>2</sup> Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada; <sup>3</sup> Estação Zootécnica Nacional; <sup>4</sup> Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa



## Pequenos ruminantes –

Small ruminants –

A.A.M. Marinho<sup>1</sup>,  
I. Ribeiro<sup>3</sup> & C.L. Vilela<sup>4</sup>

Mecanismos de infecção e a resposta imunitária local e sistémica do animal, com o objectivo de compreender os mecanismos de infecção e a resposta imunitária em outros estudos na área da epidemiologia e da fisiopatologia da mastite, com o objectivo de compreender a modulação da resposta imunitária da mamária, poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico base na estimulação da resposta imunitária, alternativos ao uso de

Antibióticos. A compreensão da etiologia e da fisiopatologia da mastite, com o objectivo de compreender a modulação da resposta imunitária da mamária, poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico base na estimulação da resposta imunitária, alternativos ao uso de

### ABSTRACT

Ruminant Mastitis Unit”, created in the scope of the National Programme of Re-equipment and Technology Foundation and the collaborative work of research groups that have been active in the study of small ruminants infections, related to animal health and public health and food safety. Its main purpose is to create a suitable environment for re-

Apartado 94, 7002-554 Évora, Herdade da Abóbada; Instituto de Sanidade Animal –

search and scientific communication that may contribute to reduce mastitis prevalence in small ruminants and thus to improve milk production and quality, with benefits for both milk and cheese producers as well as protecting food consumers.

Work already developed by this team comprises isolation and identification of ovine mastitis pathogens, detection of virulence factors in the most relevant bacteria, studies on the infection mechanisms and host local and systemic immune response and other epidemiological studies.

A deeper knowledge of aetiology and physiopathology of ovine mastitis, aiming at understanding the immune response modulation, may contribute to the development of control methods based on immune stimulation, alternative to antibiotic treatment.

### INTRODUÇÃO

As mastites são infecções frequentes em ovelhas, de particular importância em animais de aptidão leiteira, mas afectando igualmente raças produtoras de carne. Estas infecções causam prejuízos económicos consideráveis, podendo comprometer a função mamária ou mesmo resultar na morte dos animais. As suas consequências estendem-se aos borregos, que apresentam menor crescimento (Larsgard e Vaabenoe, 1993).

As infecções intramamárias em pequenos ruminantes, tal como em bovinos, podem apresentar-se sob uma forma clínica, com sintomas facilmente detectáveis, ou sob uma forma subclínica, que frequentemente passa despercebida aos produtores. Estes processos são sempre responsáveis por importantes quebras de produção de leite em ovinos (Gonzalo *et al.*, 2002). No caso de infecções subclínicas, o leite pro-

duzido, embora possa não apresentar alterações visíveis, é de qualidade inferior (Ariznabarreta *et al.*, 2002). As suas características químicas e microbiológicas determinam um menor rendimento tecnológico, aquando do fabrico de queijo (Silanikove *et al.*, 2005) e podem pôr em risco a saúde dos consumidores (De Buyser *et al.*, 2001). Alguns dos microrganismos responsáveis por mastites subclínicas em pequenos ruminantes são produtores de toxinas, nomeadamente *Staphylococcus aureus* e *Staphylococci* coagulase negativos (Orden *et al.*, 1992), tendo sido isoladas algumas destas espécies no decurso dos nossos trabalhos (Queiroga *et al.*, 1999a; Vilela *et al.*, 1999).

Tratando-se de um processo infeccioso, o animal afectado está sujeito a desconforto, contrariando a directiva europeia que determina ser necessário “assegurar que os animais não sejam sujeitos a dores ou sofrimento evitáveis.” (Comunidades Europeias, 2005). Por outro lado, alguns dos agentes etiológicos de mastite são contagiosos e, nos casos de doença subclínica, constituem uma fonte de disseminação silenciosa.

O tratamento e profilaxia de mastites em bovinos assentam na utilização de fármacos antimicrobianos; estas estratégias podem ser adaptadas a ovinos com resultados positivos na redução da prevalência de mastites (Tietze, *et al.*, 1993). Porém, a utilização de antibióticos exerce uma pressão de selecção que leva à emergência de estirpes resistentes a estes fármacos (Costa, 2005), as quais podem originar surtos de infecções com microrganismos resistentes, tanto em animais (Rajala-Schultz *et al.*, 2005) como em humanos (Angulo *et al.*, 2004).

A Unidade de Estudos de Mastites em Pequenos Ruminantes tem como objectivos pesquisar a etiologia e fisiopatologia



das mastites nestas espécies animais (até à data, foram desenvolvidos estudos em ovinos), estudar a modulação da resposta imunológica da glândula mamária, conhecer o perfil de antibioresistência das estirpes locais de forma a contribuir para o uso prudente de antibióticos e investigar métodos de profilaxia e tratamento alternativos ao uso de antibióticos com base na estimulação da resposta imunitária, contribuindo assim para reduzir o uso destes agentes antimicrobianos em saúde animal, como tem sido preconizado pela OMS (WHO, 2000).

### SÚMULA DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os trabalhos realizados pela equipa envolvida neste projecto revelaram que, no Alentejo, apesar de a prevalência de mastite clínica em ovelhas ser baixa, a mastite subclínica apresenta uma prevalência muito elevada (Queiroga *et al.*, 1997). Nos efectivos estudados, o valor médio de prevalência de infecção subclínica é de 31,7%, podendo atingir 92,5% dos animais afectados.

Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados foram *Staphylococci* coagulase negativos, entre os quais se destacou *Staphylococcus epidermidis* (Queiroga *et al.*, 1999a; Vilela *et al.*, 1999). Os microrganismos isolados mostraram-se, na sua maioria, susceptíveis aos antibióticos incluídos em preparações medicamentosas de aplicação intramamária desenvolvidas para bovinos (Queiroga *et al.*, 1999a; Queiroga *et al.*, 1999b). Porém, os isolados de *Streptococcus agalactiae* revelaram menor susceptibilidade a alguns princípios activos, nomeadamente penicilina, do que o descrito em isolados de outros Países (Erskine *et al.*, 2002; Queiroga *et al.*, 2003).

Em estirpes de *Staphylococcus epidermidis* isolados de mastite ovina, foi realizada a pesquisa de proteínas antigénicas, cujo reconhecimento por imunoglobulinas presentes no soro e no leite de animais infectados naturalmente por *Staphylococcus epidermidis* sugere um potencial papel na resposta imunológica específica na glândula mamária de ovelhas (Queiroga *et al.*, 1999c; Queiroga *et al.*, 2001a; 2001b; 2001c).

Foi efectuada a pesquisa de factores de virulência em isolados de campo, tendo-se verificado que estirpes de *Staphylococcus epidermidis* causadoras de mastites subclínicas não eram produtoras de enterotoxinas A, B, C e D nem de toxina responsável pelo choque tóxico (*toxic shock syndrome toxin*, TSST-1). As mesmas estirpes apresentaram diferenças em relação à sua capacidade para produzir biofilme *in vitro*. Foram realizados estudos de adesão *in vitro* a células epiteliais de glândula mamária (linha celular BME), que mostraram que algumas estirpes possuem a capacidade de aderir ao epitélio mamário. No entanto, a capacidade de produzir biofilme não está correlacionada com a intensidade da inflamação na glândula mamária, as diferenças de produção de biofilme entre as estirpes que produzem diferentes graus de inflamação na glândula mamária não são significativas ( $P \geq 0,05$ ). A aptidão das diversas estirpes de *Staph. epidermidis* para produzir biofilme não interfere com a capacidade para aderir a células do epitélio mamário *in vitro* (Queiroga *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c).

Estudos de manipulação da dieta, em que foi comparada a dieta normal com dieta suplementada com zinco biodisponível, mostraram uma redução significativa na adesão, *in vitro*, de bactérias a células epiteliais da glândula mamária (Saianda *et al.*, 1999; Saianda *et al.*, 2001), sugerindo ser



possível a adopção de novas estratégias de controlo de infecções intramamárias.

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os trabalhos já realizados indicam que a prevalência de mastites subclínicas em ovelhas no Alentejo é elevada. Face ao impacto negativo sobre a saúde animal, a saúde pública e a economia das explorações, julgamos necessário diminuir esta prevalência. As medidas de controlo a implementar deverão oferecer garantias de segurança aos consumidores. Estas garantias devem contemplar a redução na utilização de antimicrobianos, na medida em que o Reg (CE) 2377/90, actualmente em vigor, estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) para algumas substâncias que podem estar presentes no leite e seus derivados.

Na sequência lógica dos trabalhos desenvolvidos, o objectivo que nos propomos alcançar é o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que contemplem o conceito de uso prudente de antibióticos. Para tal, propomo-nos:

- Aprofundar os estudos sobre factores de virulência dos agentes etiológicos de mastites clínicas e subclínicas de pequenos ruminantes;
- Investigar a modulação da resposta imunitária da glândula mamária;
- Identificar antigénios com capacidade para induzir uma resposta imunitária protectora.

Além disso, é importante conhecer as especificidades dos animais dos efectivos nacionais e esclarecer os produtores sobre a importância e o interesse na aplicação das medidas de profilaxia de mastite. Assim, pretendemos ainda:

- Aferir métodos de diagnóstico de mastites para as raças nacionais;

- Desenvolver acções de informação e apoio a produtores, nomeadamente, estabelecendo uma rotina de apoio a produtores de leite de forma a melhorar a qualidade do leite de ovelha e cabra que se produz na nossa região.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo, F. J., Nargund, V. N. & Chiller, T. C. 2004. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med.*, **51**: 374-379.
- Ariznabarreta, A., Gonzalo, C. & San Primitivo, F. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *J. Dairy Sci.*, **85** (6): 1370-1375.
- Costa, P. M. 2005. Antibiorresistências na flora entérica (*Enterococcus spp.* e *Escherichia coli*) de frangos e humanos. *Livro de Resumos do Congresso de Ciências Veterinárias 2005*, p. 66. Santarém, Portugal.
- De Buyser, M. L., Dufour, B., Marie, M. & Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**: 1-17.
- Erskine, R. J., Walker, R. D., Bolin, C. A., Bartlett, P. C. & White, D.G. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.*, **85**: 1111-1118.
- Comunidades Europeias. 2005. Do campo à mesa. Uma alimentação segura para os consumidores europeus. Série: *A Europa em movimento*. Luxemburgo: Serviço



- das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias.
- Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J. A. & San Primitivo, F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J. Dairy Sci.*, **85** (6): 1460-1467.
- Larsgard, A. G. & Vaabenoe, A. 1993. Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. *Small Rumin. Res.*, **12**: 339-347.
- Orden, J. A., Cid, D., Blanco, M. E., Ruiz Santa Quiteria, J. A., Gomez-Lucia, E. & De La Fuente, R. 1992. Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin-one Production by *Staphylococci* Isolated from Mastitis in Sheep. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **100** (2): 132-134.
- Queiroga, M. C., Marcelino, P. P., Espadaneira, E. M. & Vilela, C. L. 1997. Rastreio de mamites em ovinos: Estudo preliminar. *Vet. Téc.*, **2**: 52-55.
- Queiroga, M. C., Tamagnini, M. F. T., Saianda, I. M., Matos, C. A. P., Marinho, A. A. M. & Vilela, C. L. 1999a. Mamites em ovinos: Microorganismos causais e sua susceptibilidade a quimioterápicos. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, **XCIV** (531): 132-140.
- Queiroga, M. C., Saianda, I. M., Marinho, A. A. M. & Vilela, C. L. 1999b. Antibiotic susceptibility profile of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from sheep mastitis. *Actas do Congresso Nacional de Microbiologia MICRO'99*, p. 200. Luso, Portugal.
- Queiroga, M. C., Martins, C. & Vilela, C. L. 1999c. Electrophoretic transfer of proteins applied to lymphoproliferation assays as a tool to design vaccines. *Arquivos de Patologia Geral e Anatomia Patológica da Universidade de Coimbra*, **31** (supl.): 18.
- Queiroga, M. C., Martins, C. & Vilela, C. L. 2001a. Major antigenic proteins of *Staphylococcus epidermidis* isolated from mastitic ewes, recognised by milk whey antibodies. *1st International Symposium – Research in Veterinary Science*, p. 49. Lisboa, Portugal.
- Queiroga, M. C., Saraiva, A. P. & Vilela, C. L. 2001b. Resposta imunitária humoral a proteínas de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de mamites ovinas em Portugal [Humoral immune response to proteins of *Staphylococcus epidermidis* isolated from ovine mastitis in Portugal]. *IX Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa*, p. 265. Novembro, S. Salvador da Bahia, Brasil.
- Queiroga, M. C., Saraiva, A. P. & Vilela, C. L. 2001c. Antígenos de *Staphylococcus epidermidis* em mamites ovinas. *Actas do Congresso Nacional de Microbiologia MICRO'2001*, p. 133. Póvoa de Varzim, Portugal.
- Queiroga, M. C., Marinho, A. M. & Vilela, C. L. 2003. Antibiotic resistance profile of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* causing contagious mastitis in sheep. *Actas do Congresso Nacional de Microbiologia MICRO'2003*, p. 256. Tomar, Portugal.
- Queiroga, M. C., Marinho, A. A. M., Bexiga, R., Cavaco, L. M. & Vilela, C. L. 2005a. Slime production and adherence to mammary epithelial cells of *Staphylococcus epidermidis* isolated from sub-clinical mastitis in sheep – an *in vitro* study. *Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference*, p. 920. Maastricht, The Netherlands.
- Queiroga, M. C., Fraústo da Silva, M. & Vilela, C. L. 2005b. Produção de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* responsáveis por mastites subclínicas em ovinos. *Livro de Resumos do 3º*



- Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, p. 80. Santarém, Portugal.
- Queiroga, M. C., Marinho, A. A. M., Bexiga, R., Cavaco, L. M. & Vilela, C. L. 2005c. Slime production does not hinder *Staphylococcus epidermidis* adherence to epithelial cells – an *in vitro* study with clinical isolates from ovine mastitis. *Actas do Congresso Nacional de Microbiologia MICRO'05 Biotec'05*, p. 327. Póvoa de Varzim, Portugal.
- Rajala-Schultz, P. J., Torres, A., Rajeev, S., DeGraves, F. J. & Silveira, F. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* isolated at dry-off and calving. *Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference*, pp. 684-687. Maastricht, The Netherlands.
- Saianda, I. M., Bettencourt, C. M. V., Queiroga, M. C., Ferreira-Dias, G. & Vilela, C. L. 1999. Possible role of trace elements in mammary gland colonisation. *Proceedings of the 7th Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*, pp. 83-88. Santarém, Portugal.
- Saianda, I. M., Bettencourt, C. M. V., Queiroga, M. C., Ferreira-Dias, G. & Vilela, C. L. 2001. Possible role of trace elements in mammary gland colonisation. *1st International Symposium – Research in Veterinary Science*, p. 50. Lisboa, Portugal.
- Silanikove, N., Shapiro, F., Leitner, G. & Merin, U. 2005. Subclinical mastitis affects the plasmin system, milk composition and curd yield in sheep and goats: comparative aspects. *Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference*, pp. 511- 516. Maastricht, The Netherlands.
- Tietze, M., Majewski, T. & Szymanowska, A. 1993. Occurrence and prophylaxis of subclinical mastitis of sheep. *Proceedings of the 5th International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*, pp. 121-126. Budapest, Hungria.
- Vilela, C. L., Queiroga, M. C., Saianda, I. M. & Marinho, A. A. M. 1999. Importance of skin resident microbiota in sheep mammary gland pathology. *Proceedings of the National Congress of Microbiology*, p. 186. Luso, Portugal.
- WHO 2000. World Health Organization. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: report of a WHO consultation. Consultado em Novembro de 2005 no endereço [http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO\\_CDS\\_CSRAPH\\_2000.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSRAPH_2000.4.pdf).