

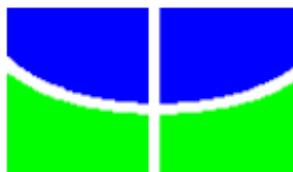
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MASTITE INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus* EM BUBALINOS E BOVINOS
LEITEIROS**

ANDREA MARIA LAZZARI

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MASTITE INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus* EM BUBALINOS E BOVINOS
LEITEIROS

ANDREA MARIA LAZZARI

Orientador: PROF. DR. JAIRO PEREIRA NEVES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Publicação: 76D / 2012

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2012

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

LAZZARI, A. M. **Mastite induzida por *Staphylococcus aureus* em bubalinos e bovinos leiteiros.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 138p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

LAZZARI, Andrea Maria. **Mastite induzida por *Staphylococcus aureus* em bubalinos e bovinos leiteiros.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012. 138p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Mastite - Indução. 2. Bovino. 3. Bubalino. I. Lazzari, A. M. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MASTITE INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus* EM BUBALINOS E BOVINOS
LEITEIROS**

ANDREA MARIA LAZZARI

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Animais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em Ciências Animais”.

APROVADA POR:

**Prof. Dr. JAIRO PEREIRA NEVES, UnB – Brasília, DF
(ORIENTADOR)**

Prof^a Dr^a AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS, UFSM – Santa Maria, RS

Prof. Dr. ALBENONES JOSÉ DE MESQUITA, UFG - Goiânia, GO

Prof^a Dr^a MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA, UnB – Brasília, DF

Prof. Dr. IVO PIVATO, UnB – Brasília, DF

BRASÍLIA/DF, 6 DE DEZEMBRO DE 2012

À minha Família amada e inspiradora.
Ao meu amigo...Deus.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Augusto César e André que proporcionaram momentos doces, alentadores e inspiradores durante esta fase da minha vida. Torço para que meus esforços e momentos de ausência sejam percebidos por estas duas crianças como uma forma de luta e persistência.

Ao meu marido Sergio por compreender minhas ausências e falhas, e ser mãe e pai quando não pude estar com nossos filhos.

Aos meus pais, Maria Nelly e Getúlio Augusto por terem semeado tão nobres conceitos, atitudes e sentimentos no ser que Deus lhes confiou. O que sou, onde estou, o que tenho, devo à vocês.

Ao Prof. Dr. Jairo Pereira Neves pela orientação neste trabalho, pelo apoio financeiro e pelo exemplo de retidão e competência.

Às minhas amigas Fabiana Elias e Adriana Moraes da Silva, pelo apoio através de atitudes e palavras.

À Marília Snel de Oliveira pela participação, apoio e orientação durante e após a fase experimental dessa tese e por ainda ser uma grande amiga.

À Prof. Dr^a Fernanda Mulinari, que tanto me auxiliou e encorajou.

Aos alunos que me auxiliaram em várias fases do experimento, em especial, Artur Heitor de Andrade, Bruno Moreti, Gabriela Guimarães, Fernanda Krug, Giovana Noleto, Veralúcia Rodrigues e Carolina Mota Carvalho.

À UPIS – Faculdades Integradas, por disponibilizar as búfalas, local e instalações para o desenvolvimento do experimento.

Aos colaboradores da Fazenda e do Laboratório de apoio da UPIS por seus grandes préstimos.

À Prof. Dr^a Agueda Castagna de Vargas, do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), agradeço pela minha formação e pelo isolamento e doação da bactéria inoculada.

Ao Prof. Dr. Albenones José de Mesquita, do Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela realização do teste de CECS e avaliação da composição do leite.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Souza Dias, do Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (MG) pela pesquisa do perfil enterotoxigênico e o potencial para produção de TSST-1 no *S. aureus* utilizado.

À pesquisadora Dr^a Anamelia Lorenzetti Bocca do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), pelo apoio no desenvolvimento desta tese e orientação na realização do teste de ELISA.

À pesquisadora Dr^a Kelly Grace Magalhães do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), pela realização do teste de ELISA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília pela oportunidade.

*“O segredo não é correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*
(Mário Quintana)

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xviii
CAPITULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Problemática e Relevância.....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo geral.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Bubalina, uma espécie emergente.....	6
2.2 Composição do leite bubalino e bovino	7
2.3 Classificação das mastites.....	9
2.4 Importância da mastite	10
2.5 A mastite em bubalinos e bovinos	13
2.6 Imunidade da glândula mamária	15
2.7 Fatores de virulência e patogenia da mastite por <i>S. aureus</i>	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPITULO 2 - EFEITO DA MASTITE INDUZIDA POR <i>Staphylococcus aureus</i> (SBP 09/10) NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE BUBALINO E BOVINO.....	44
1 RESUMO.....	45
2 ABSTRACT	46
3 INTRODUÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES	59
7 AGRADECIMENTOS	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPITULO 3 - ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS PÓS-INDUÇÃO DE MASTITE POR INOCULAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> (SBP 09/10) EM VACAS E BÚFALAS	64
1 RESUMO.....	65
2 ABSTRACT	67
3 INTRODUÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1 Animais.....	71
4.2 Organograma do experimento.....	71
4.3 Preparação do inóculo e inoculação intramamária.....	71
4.4 Coleta de leite para cultura, contagem de <i>S. aureus</i> e CCS.....	72
4.5 Avaliação da resposta localizada e sistêmica à inflamação	72
4.6 Análise estatística	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	87
7 AGRADECIMENTOS	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CAPITULO 4 - RESPOSTA IMUNE INATA E SEVERIDADE DA MASTITE CLÍNICA PÓS-INOCULAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACAS E DE BÚFALAS COM <i>Staphylococcus aureus</i> (SBP 09/10)	95
1 RESUMO.....	96
2 ABSTRACT	98
3 INTRODUÇÃO	99
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
4.1 Animais.....	101
4.2 Organograma do experimento.....	101
4.3 Preparação do inóculo e inoculação intramamária.....	101
4.4 Coleta de leite para cultura, contagem de <i>S. aureus</i> e CCS.....	102
4.5 Avaliação da resposta localizada e sistêmica à inflamação	102
4.6 Pesquisa da IL-1 β na secreção láctea	103
4.7 Análise estatística.....	104
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
6 CONCLUSÕES	112
7 AGRADECIMENTOS	113
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	118

MASTITE INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus* EM BUBALINOS E BOVINOS LEITEIROS

M.Sc. Andrea Maria Lazzari
Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Brasília, DF

RESUMO

Avaliações da imunidade inata, do quadro clínico, da composição e produção de leite foram realizadas em vacas e búfalas submetidas à infecção intramamária por *Staphylococcus aureus* (SBP 09/10). Foram utilizadas 20 fêmeas primíparas, com um a dois meses de lactação, sendo 12 da espécie bubalina (raça Murrah) e 08 da espécie bovina (Holandês x Zebu), ordenhadas uma vez ao dia e com bezerro ao pé. As fêmeas foram mantidas a pasto, com água *ad libitum* e suplementadas com sal mineral e concentrado comercial. Os animais estavam livres de alterações clínicas e infecções nas glândulas mamárias. O experimento foi realizado em duas etapas, pré (Dia 1 a D3) e pós-inoculação (D4 a D14 e 30º dia pós-inoculação). No D3 foi realizada a inoculação intramamária de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* na glândula anterior esquerda (AE) e de salina esterilizada 0,85% na glândula anterior direita (AD). Nos dois períodos foram coletadas as seguintes amostras e realizados os seguintes exames e avaliações: coleta de leite para cultura; testes de caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT); ordenha das glândulas inoculadas e não inoculadas para pesagem do leite, verificação da contagem de células somáticas (CCS) e avaliação da composição (lactose, proteínas totais, gordura, extrato seco total – EST e extrato seco desengordurado – ESD); coleta de leite para mensuração da citocina interleucina-1beta (IL-1 β); avaliação da resposta sistêmica à inflamação através da aferição da temperatura retal, verificação do apetite e alteração na produção de leite e avaliação da resposta localizada à inflamação, através da aparência/consistência da glândula, CCS e características da secreção láctea. O processo inflamatório foi induzido na glândula AE de todos os animais. Foi observada migração mais rápida de células de defesa para a glândula mamária das búfalas e contagem máxima de células somáticas (CS) semelhante ($p > 0,05$) entre as duas espécies, porém em momentos distintos. Ao final do experimento, o leite da ordenha completa das búfalas apresentava níveis fisiológicos de CS, diferente do leite da ordenha completa das vacas. Foi detectada alteração ($p < 0,05$) nos teores de lactose e ESD, que apresentaram correlação negativa ($p < 0,05$) com a CCS. Todos os animais desenvolveram mastite clínica superaguda. A bactéria foi recuperada

de todas as glândulas inoculadas com o patógeno, sem diferença significativa no percentual de isolamento e no Log10 de UFC/mL de leite bovino e bubalino até o 11º dia pós-inoculação (D14). Diferença ($p < 0,001$) foi verificada no 30º dia pós-inoculação, com recuperação da bactéria em 50% das vacas e 8,3% das búfalas. Reação ao CMT foi observada nas 24h pós-inoculação, de forma mais intensa nas búfalas, com 75% e 37,5% das reações positivas com intensidade 3+, respectivamente, em búfalas e vacas ($p < 0,05$). Onze dias pós-inoculação, 100% das vacas e 50% das búfalas encontravam-se reagentes a esse teste. A CCS avaliada por método eletrônico e o CMT apresentaram resultados semelhantes, sendo que as búfalas reagiram mais intensamente que as vacas logo após a inoculação e apresentaram diminuição evidente da contagem ao final do experimento. As contagens eletrônicas de CS e o CMT revelaram correlação com a cultura bacteriana ($p < 0,001$). Algumas alterações visuais no leite e na aparência/consistência da glândula foram verificadas nas primeiras 24h. Estes dois parâmetros foram mais intensos e persistentes nas vacas, que adicionalmente apresentaram lesão ulcerativa na glândula desafiada (25%). Diminuição de produção e alteração no apetite foram evidenciados já nas primeiras 24h pós-inoculação. Houve uma redução média de produção de leite de 37,33% nas búfalas e 47,17% nas vacas. Ao final do experimento observou-se um número maior de vacas (62,5% contra 25% das búfalas) com queda superior a 61% da produção inicial de leite ($p < 0,05$). A elevação da temperatura retal foi verificada nas duas espécies, sendo que 100% das vacas e 91,6% das búfalas alcançaram temperaturas superiores à 39,6°C. Os parâmetros da resposta local à inflamação e da resposta sistêmica à inflamação, utilizados para avaliar a severidade da mastite foram classificados em escores. A média dos escores foi mais elevada na espécie bovina ($p < 0,05$). Ao longo do período de observação, verificou-se uma capacidade superior das búfalas em alcançar o *status* sanitário adequado, chegando, ao final do experimento, com os parâmetros avaliados mais próximos dos fisiológicos. A inoculação intramamária de *S. aureus* provocou elevação nas concentrações de IL-1 β nas espécies bovina e bubalina. A evolução da concentração da citocina foi diferente para as duas espécies ($p < 0,05$). As búfalas apresentaram uma elevação mais rápida e as vacas alcançaram uma concentração 1,57 vezes maior. O pico da concentração nas búfalas, ocorreu nas primeira 48h, com 0,413 ng de IL-1 β por mililitro de leite. As vacas apresentaram um aumento menos expressivo nas 24h pós-inoculação e alcançaram a concentração máxima nas 72h pós-inoculação (1,061 ng/mL). Na espécie bovina houve correlação ($p < 0,05$) entre a concentração da IL-1 β no leite, CCS, resposta localizada à inflamação e temperatura retal. As espécies bovina e bubalina alcançaram contagens máximas semelhantes ($p > 0,05$) de CS/mL de leite, porém com concentrações médias diferentes ($p < 0,05$) de IL-1 β /mL de leite, 1,061 ng/mL e 0,120 ng/mL, respectivamente.

MASTITIS INDUCED BY *Staphylococcus aureus* IN DAIRY BUBALINES AND BOVINES

M.Sc. Andrea Maria Lazzari
Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Brasília, DF

ABSTRACT

Evaluations of innate immunity, clinical picture, milk composition and production were performed in cows and buffaloes submitted to intramammary infection by *Staphylococcus aureus* (SBP 09/10). It was used 20 primiparous females between one to two months of lactation, being 12 bubalines (Murrah breed) and 08 bovines (Holstein x Zebu), milked once a day and with calf at foot. The females were kept on pasture with *ad libitum* water and supplemented with mineral salt and commercial concentrate. The animals were free of clinical alterations and infections in the mammary glands. The experiment was conducted in two stages, pre (Day 1 to D3) and post inoculation (D4 to D14 and day 30 post inoculation). On D3 it was carried out the intramammary inoculation of approximately $1,0 \times 10^3$ UFC of *S. aureus* into the left anterior gland (AE) and sterile 0.85% saline solution into the right anterior gland (AD). In both periods the following samples were collected and the following tests and evaluations were performed: milk collection for culture; strip cup tests and California Mastitis Test (CMT); milking of the inoculated and non-inoculated glands for milk weighing, verification of somatic cell count (CCS) and composition assessment (lactose, total proteins, fat, total solids - EST and nonfat solids - ESD); milk collection to measure interleukin-1beta cytokine (IL-1 β); evaluation of systemic response to inflammation by measurement of rectal temperature, verification of appetite and alteration in milk production, and assessment of localized response to inflammation by the gland appearance/consistency, CCS and features of the milk secretion. Inflammatory process was induced in AE gland of all animals. It was observed a faster migration of immune cells into the mammary gland of buffaloes and similar ($p > 0.05$) maximum somatic cell count (CS) between the two species, but at different times. At the end of the experiment, buffalo complete milking showed physiological levels of CS, different from cow complete milking. Alteration was observed ($p < 0.05$) in levels of lactose and ESD, which were negatively correlated ($p < 0.05$) to CCS. All animals developed hyperacute clinical mastitis. The bacteria was recovered from all the glands inoculated with the pathogen, with no significant difference in the isolation percentage and UFC/mL Log₁₀ of

bovine and bubaline milk until day 11 post inoculation (D14). Difference ($p < 0.001$) was observed at day 30 post inoculation, with recovery of the bacteria in 50% of cows and 8.3% of buffaloes. The CMT reaction was observed in 24h post inoculation more intensely in buffaloes with 75% and 37.5% of positive reactions with 3+ intensity, respectively, in buffaloes and cows ($p < 0.05$). Eleven days post inoculation 100% of cows and 50% of buffaloes were reagents to this test. The CCS by electronic method presented a similar result to that detected by CMT, with buffaloes reacting more intensely post inoculation and evident decreased counting at the end of the experiment. The CCS by electronic method and CMT revealed correlation with the bacterial culture ($p < 0.001$). Some visual alterations in milk and in appearance/consistency of the gland were observed in the first 24h. These two parameters were more intense and persistent in cows, which additionally showed ulcerative lesions in the challenged gland (25%). Decreased production and appetite alterations were seen just within the first 24h post inoculation. There was a milk production average reduction of 37.33% in buffaloes and 47.17% in cows. At the end of the experiment there was a greater number of cows (62.5% versus 25% of buffaloes) with a drop superior to 61% of the initial milk production ($p < 0.05$). The increase in rectal temperature was observed in both species, with 100% of cows and 91.6% of buffaloes reaching temperatures higher than 39.6°C. The parameters of local response to inflammation and systemic response to inflammation, used to evaluate the severity of mastitis were classified by scores. The mean score was higher in the bovine species ($p < 0.05$). Throughout the observation period, there was a higher capacity of buffaloes in reaching the appropriate sanitary status, getting parameters closer to physiological ones at the end of the experiment. The intramammary *S. aureus* inoculation caused an increase in IL-1 β concentrations of bovines and bubalines. The evolution of the cytokine concentration was different between the two species ($p < 0.05$). Buffaloes showed a faster rise and cows reached an 1.57 fold higher concentration. The buffaloes concentration peak occurred in 48h with 0.413 ng of IL-1 β per milliliter of milk. The cows showed a less expressive increase in 24h post inoculation and reached a maximum concentration in 72h post inoculation (1.061 ng/mL). In bovine there was correlation ($p < 0.05$) among the milk IL-1 β concentration, CCS, localized response to inflammation and rectal temperature. The bovine and bubaline species reached similar maximum countings ($p > 0.05$) of milk CS/mL, but with different mean concentrations ($p < 0.05$) of milk IL-1 β /mL, 1.061 ng/mL and 0.120 ng/mL, respectively.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 1- Efeito da inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE e de 5 mL de salina esterilizada 0,85% na teta AD de vacas e búfalas sobre a CECS (mediana) nos diferentes dias do experimento. 52
- Figura 2 - Efeito da inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S.aureus* na teta AE e de 5 mL de salina esterilizada 0,85% na teta AD de fêmeas bovinas e bubalinas, sobre a CECS (mediana) no leite da ordenha completa do animal, nos diferentes dias do experimento. 54

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Cultura bacteriana do leite do quarto AE de vacas e búfalas após a inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) nos diferentes dias do experimento 75
- Figura 2 – Contagem bacteriana (Log10 UFC/mL) e desvio padrão do quarto AE de vacas e búfalas após a inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) nos diferentes dias do experimento..... 77
- Figura 3 – Relação entre o percentual de positivos pelo teste CMT (A), e o Log10 da CCS (B), pré e pós-inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE de vacas e búfalas, nos diferentes dias do experimento..... 80
- Figura 4 – Percentual de vacas e búfalas com o quarto AE positivo na caneca telada, pós-indução de mastite por inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10), nos diferentes dias de amostragem do leite 82
- Figura 5 – Média do escore total bovino (A) e bubalino (B) pós-inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE de vacas e búfalas, nos diferentes dias do experimento 85

CAPÍTULO 4

- Figura 1 – Efeito da inoculação de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na concentração (média) de IL-1 β no leite da glândula AE de vacas e búfalas..... 107
- Figura 2 – Efeito da inoculação de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na CCS/mL de leite (mediana) da glândula AE de vacas e búfalas..... 109
- Figura 3 – Média do escore local, bovino e bubalino, pós-inoculação intramamária de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE, nos diferentes dias do experimento. 110
- Figura 4 – Média da temperatura retal, bovina e bubalina, pós-inoculação intramamária de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE, nos diferentes dias do experimento..... 111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Média e desvio padrão da produção e composição do leite pré e pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) em bubalinos e bovinos..... 55

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Critérios utilizados para avaliar a severidade da mastite em vacas e búfalas pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) na glândula AE..... 73

Tabela 2 - Distribuição das amostras de leite da glândula AE de acordo com a espécie (frequência, %), CCS e dias de coleta, considerando-se < 200.000 como negativo, entre 200.000 – 300.000 como indeterminado e > 300.000 como suspeito..... 79

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Critérios utilizados para avaliar a resposta localizada à inflamação em vacas e em búfalas pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) na glândula AE 103

Tabela 2 - Concentrações médias, mínimas e máximas de IL-1 β no leite da glândula AE e desvios padrões* pré (D3) e pós-inoculação (D4, D5, D6 e D7) de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) em vacas e búfalas..... 107

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AD – anterior direita
AE – anterior esquerda
AS – ágar sangue
BSA – albumina de soro bovino
CMT – *California Mastitis Test*
CCS – contagem de células somáticas
CECS – contagem eletrônica de células somáticas
CS – células somáticas
D – dia
ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática
ESD – extrato seco desengordurado
EST – extrato seco total
NAG – N-acetil glicosamida
NAM – N-acetil muramato
NK – *natural killer*
Freqmédica – frequência média
IL1-1 β – interleucina 1-beta
IN – instrução normativa
p – nível de significância
PAMPs – padrões moleculares associados ao patógeno
PBS – tampão fosfato-salina
PD – posterior direita
PE – posterior esquerda
PRR – receptores de reconhecimento de padrões
r – coeficiente de correlação
SBP – setor de bacteriologia pesquisa
SED – enterotoxina estafilocócica do tipo D
SEs – enterotoxinas estafilocócicas
T° - temperatura
TSST-1 – toxina da síndrome do choque tóxico
UFC – unidades formadoras de colônias
UI – unidades internacionais
WMT – *Wisconsin Mastitis Test*

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

A mastite representa a principal doença infecto-contagiosa que acomete mamíferos explorados comercialmente para a produção de leite. A inflamação da glândula mamária provoca alterações físico-químicas do leite, diminuição na produção, problemas na elaboração de derivados e riscos à população consumidora (Carvalho et al., 2007; Cassol et al., 2010; Mungatana et al., 2011). Esse processo inflamatório tem sido amplamente pesquisado nas espécies bovina e caprina, apresentando uma grande carência de informações na espécie bubalina.

O índice de mastite em bovinos é bastante variado, dependendo da região, das características ambientais e individuais e do manejo instituído na propriedade (Sá et al., 2004; Contreras & Rodríguez, 2011). Percentuais baixos como 1,3% (Oliveira et al., 2011) e elevados como 90% (Pereira, 2007) foram descritos no Brasil. Em bubalinos, a inflamação parece ocorrer com menor frequência. Apesar disso, alguns pesquisadores relataram índices bastante expressivos, com variação entre 3% a 69% (Costa et al., 1997; Lazzari et al., 2002; Khan & Muhammad, 2005; Özenç et al., 2008).

Entre os agentes etiológicos das mastites bovina e bubalina destaca-se *Staphylococcus aureus*, normalmente causador da mastite considerada de maior impacto econômico, a subclínica (Kapronezai et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Fadlelmoula et al., 2007).

O interesse pela criação da espécie bubalina tem aumentado nos últimos anos. Dados da FAO (2010) registram uma grande elevação na população mundial de búfalos. Algumas características dessa espécie justificam esse panorama, como a capacidade de produzir proteína de alta qualidade, representada pelo leite e pela carne, mesmo alimentando-se com forrageiras de baixa qualidade (Araújo & Gheller, 2005).

Com o crescimento populacional de búfalos no Brasil e no mundo, com tendência para o aumento da exploração leiteira dessa espécie, surge a necessidade de esclarecer aspectos relacionados à imunidade, ao processo inflamatório da glândula mamária e aos métodos de diagnóstico.

Alguns trabalhos, voltados à pesquisa da imunidade da glândula mamária de vacas e búfalas, relataram a possibilidade de maior resistência desta segunda espécie à mastite. Pesquisadores citaram particularidades morfológicas, funcionais, químicas e celulares que seriam responsáveis por essa característica (Franciscis & Dipalo, 1994; Silva & Silva, 1994; Araújo & Gheller, 2005).

Alguns experimentos com indução de mastite foram realizados em vacas leiteiras gerando informações clínicas e imunológicas, bem como informações sobre produção e alterações na composição do leite. Dentre os aspectos pesquisados, destaca-se a avaliação das células somáticas do leite, que é rotineiramente utilizada na detecção do processo inflamatório, pesquisa de citocinas, alteração físico-química do leite e manifestações clínicas locais e sistêmicas (Bannerman et al., 2004; Almeida et al., 2005; Bannerman, Paape & Chockalingam, 2006; Sarikaya et al., 2006; Martins Filho et al., 2007).

Atualmente o método mais utilizado para detecção da mastite nas diferentes espécies animais é a contagem de células somáticas (CCS). Esta contagem tem sido utilizada para avaliar a qualidade do leite bovino pelas indústrias de laticínios, gerando a remuneração diferenciada ao produtor. Algumas pesquisas, realizadas com búfalas apresentando mastite, apresentaram resultados inconclusivos para CCS. Vários autores afirmam que o uso de parâmetros bovinos de CCS para a inferência de mastite em búfalas tem se mostrado inadequado e insatisfatório (Amaral et al., 2005; Carvalho, 2005; Escrivão et al., 2008).

O modelo que hoje se utiliza para entender o processo inflamatório na glândula mamária de búfalas é quase que exclusivamente extrapolado do que se conhece para espécie bovina. Entretanto é necessário conhecer as reais semelhanças e diferenças existentes para a adequação do manejo e controle. Isto será possível a partir da exposição das duas espécies ao mesmo patógeno, sob condições semelhantes de manejo e ambiente.

1.1 Problemática e Relevância

O Brasil apresenta o maior rebanho bubalino das Américas e o leite produzido por essa espécie tem apresentado um excelente valor comercial, com preços que podem

chegar ao triplo do valor pago pelo leite bovino e com ampla utilização na produção de queijo tipo mussarela, derivado que apresenta mercado assegurado com preços compensatórios.

A tendência mundial em aumentar a exploração leiteira de búfalas e a exigência do mercado para que leite de boa qualidade chegue ao consumidor e à indústria de laticínios, remete à principal enfermidade da glândula mamária que é a mastite.

O conhecimento da imunidade da glândula mamária das búfalas, das características do processo inflamatório e dos métodos utilizados para o diagnóstico dessa enfermidade, se fundamentam, em grande parte, nos conhecimentos existentes em outras espécies animais. Existe a necessidade de conhecer as particularidades da espécie bubalina, avaliando semelhanças e diferenças do processo inflamatório da glândula mamária bovina.

O conhecimento obtido será importante para definir os padrões do processo inflamatório na glândula mamária de búfalas e servirá de subsídio para implementação de métodos diagnósticos adaptados a essa espécie.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta inflamatória, a produção e a composição do leite de búfalas e de vacas, submetidas à mastite induzida pela inoculação intramamária de um mesmo isolado de *S. aureus* (SBP 09/10).

1.2.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração e avaliar o comportamento da citocina interleucina 1-beta (IL-1 β) na secreção láctea de búfalas e vacas antes e pós-indução de mastite por *S. aureus*;

Avaliar e correlacionar os resultados dos testes da caneca telada, *California Mastitis Test* (CMT) e contagem de células somáticas (CCS) entre si e com a cultura bacteriana qualitativa realizada com o leite das duas espécies;

Verificar alterações clínicas locais e sistêmicas em búfalas e em vacas pós-indução de mastite por *S. aureus* e correlacionar com CCS e concentração de IL-1 β no leite das duas espécies;

Verificar a produção e a composição do leite de búfalas e vacas antes e pós-indução da mastite e correlacionar com os parâmetros da resposta inflamatória;

Comparar os parâmetros avaliados nas duas espécies antes e pós-indução da mastite pelo mesmo patógeno contagioso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bubalina, uma espécie emergente

Os búfalos domesticados estão classificados como *Bubalus bubalis* e a espécie dividida em duas subespécies, búfalo de rio (*Bubalus bubalis fluviatilis* ou *bubalis*) e búfalo de pântano (*Bubalus bubalis limneticus* ou *kerabau*) (Singh, Nanda & Adams, 2000; Crudeli & Patiño, 2011). São criados em todos os continentes com algumas diferenças na distribuição das subespécies. Búfalos de rio são comumente encontrados na Índia, região Mediterrânea da Europa, América do Sul e Caribe, enquanto os búfalos de pântano na Ásia e China (Crudeli & Patiño, 2011).

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), as quatro raças oficialmente reconhecidas no Brasil são Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo (búfalos de rio) e Carabao (búfalo de pântano). As raças apresentam diferentes propósitos, sendo as de rio para produção de leite, carne e tração, e a de pântano, para tração e produção de carne (Xiao, 1988 apud Singh, Nanda & Adams, 2000).

A população bubalina mundial é estimada em aproximadamente 194 milhões de cabeças, das quais mais de 100 milhões encontram-se na Índia (FAO, 2010). Segundo o IBGE (2010a), a região do Brasil com o maior número de búfalos é a Norte (752.830 cabeças), com destaque para o Pará, que responde por 39% do rebanho nacional, seguida pelas regiões Sul (124.133), Sudeste (122.312), Nordeste (120.458) e Centro-Oeste (64.778). As raças bubalinas que mais se destacam no Brasil são a Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo. A raça Murrah é amplamente criada, sendo considerada a mais importante e eficiente produtora de leite (Sampaio Neto et al., 2001).

A bovinocultura leiteira no Brasil e no mundo é uma das principais atividades do agronegócio. A produção mundial de leite de vaca em 2009 foi de 583 bilhões de litros e a de búfala, de 92 bilhões de litros. O Brasil produziu, em 2010, 30,7 bilhões de litros de leite de vaca, sendo considerado o quinto maior produtor do mundo, porém, o setor caracteriza-se por apresentar ainda uma grande heterogeneidade e baixa produtividade, com a grande maioria das vacas ordenhadas (63%) produzindo menos de 4 kg/vaca/dia (IBGE, 2010; Zoccal & Stock, 2011).

O leite bubalino é o segundo mais produzido (Ménard et al., 2010). É responsável por 13,12% da produção mundial e pode se tornar uma atividade econômica cada vez mais atraente (FAO, 2010). No Brasil a produção média de leite bubalino, é de 1.583 litros por lactação, sendo que cerca de 30,9% das búfalas produzem mais de 2.000 litros de leite por lactação (Rosa et al., 2007). Tonhati et al., (2000) encontraram médias de produção leiteira de $1.259,47 \pm 523,09$ kg, em rebanhos explorados no Estado de São Paulo. Em Botucatu, São Paulo, no Departamento de Produção e Exploração Animal da UNESP foi detectada uma produção diária de leite de $4,07 \pm 1,3$ kg e a produção ajustada para os 270 dias, de $1.214,25 \pm 293,54$ kg (Jorge et al., 2005). Cerón-Muñoz et al. (2002), encontraram, em rebanho bubalino do Estado de São Paulo, médias de produção diária de leite variando de 7,65 kg a 3,83 kg ao longo da lactação. No Paquistão, segundo maior produtor de leite bubalino, a média por búfala foi de 5,51 L/dia (Khan et al., 2011). O melhoramento zootécnico das raças bubalinas para a produção de leite, tem sido pouco explorado. Dados relatados por Rodrigues et al. (2010) revelaram a possibilidade do melhoramento genético para aumento da produção de leite e gordura e aumento na duração da lactação.

O que tem alavancado a bubalinocultura no Brasil e no mundo são aspectos que diferenciam esta espécie dos bovinos, como altas taxas de natalidade e baixas de mortalidade, a prolificidade e rusticidade, composição do leite e a grande adaptação dessa espécie a diferentes ecossistemas (Cassiano et al., 2003; Zicarelli, 2004).

2.2 Composição do leite bubalino e bovino

O leite, sob o ponto de vista legal, é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (MAPA, 2011). É um produto complexo e nutritivo que contém mais de 100 substâncias. Na composição do leite, constam a parte úmida, representada pela água, e a parte sólida, representada por dois grupos de componentes, o extrato seco total (EST) e o extrato seco

desengordurado (ESD). O EST é composto pela gordura, açúcar, proteínas e sais minerais e o desengordurado por todos os componentes, exceto a gordura (Fonseca & Santos, 2000).

O teor de EST registrado na literatura é bastante variável, de 12,54 a 19,40 g/dl para as búfalas e de 11,20 a 14,30 g/dl para as vacas (Céron-Muñoz et al., 2000a; Patiño, 2004; Braun & Preuss, 2008; Mahmood & Usman, 2010; Bastos & Birgel, 2011).

Industrialmente, as substâncias mais valorizadas do leite são a caseína, lactose e matéria gorda. Seus teores são variáveis de acordo com alimentação, sanidade, idade, estágio de lactação e raça do animal (Urashima, Fukuda & Messer, 2012).

O maior percentual de proteínas presentes no leite é sintetizado pelas células secretoras da glândula mamária e representado pela caseína (81%) e pela maioria das proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina, ceruloplasmina, prolactina e lactogênio placentário). A albumina e imunoglobulinas, também classificadas como proteínas do soro, são sintetizadas fora da glândula mamária e transportadas pelo sangue até as células secretoras (Park & Jacobson, 1996). Segundo Franciscis & Dipalo (1994), a caseína constitui cerca de 77-79% da fração protéica do leite bubalino enquanto que as proteínas do soro correspondem a 21-23%.

A matéria gorda do leite é composta quase que exclusivamente por triglicerídeos (98%) que são completamente sintetizados nas células epiteliais da glândula mamária. O teor médio de gordura no leite de vacas varia de 3,3 a 4,5% (Gonzáles, 2001; Venturine, Sarcinelli & Silva, 2007; Medhammar et al., 2011). Em búfalas, a porcentagem de gordura oscila entre 5,1% e 10,4% (Gonzáles, 2001; Rosa et al., 2007; Roshanfekar, Mamouei, Bojarpous, 2010; Khan et al., 2011; Medhammar et al., 2011).

Leite e colostro contém cerca de 10% de carboidratos sendo que o principal, que corresponde a 80% do conteúdo dessa biomolécula, é a lactose (Urashima, Fukuda & Messer, 2012). A lactose é um dissacarídeo sintetizado na glândula mamária que exerce importante controle no volume de leite. Cada micrograma de lactose secretada no lúmen alveolar arrasta aproximadamente 10 vezes o peso em água (Fonseca & Santos, 2000).

Gonzáles (2001), em uma ampla revisão sobre composição química do leite de várias espécies, citou, para as diferentes raças bovinas o seguinte percentual médio para proteína e lactose: 3,65 e 4,9, respectivamente. Para as búfalas, o mesmo autor apontou percentuais de 5,9 para proteína e 4,3 para lactose. Outro trabalho que analisou a biodiversidade existente entre espécies de mamíferos, relatou percentuais de 3,2 e 4,0 para proteína e 5,1 e 4,4 para lactose, respectivamente, em vacas e búfalas (Medhammar et al., 2011).

Macedo et al. (2001), analisando as características do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Estado de São Paulo, encontraram 4,13% de proteínas totais. Lopes (2009) detectou percentual de proteína de 4,01 e de lactose de 4,72 em búfalas, predominantemente da raça Murrah, criadas em Pernambuco. Tonhati et al. (2000) observaram médias de $3,91 \pm 0,61\%$ para proteína em leite de búfalas das raças Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo e seus mestiços. Variações ao longo da lactação foram relatadas por Céron-Muñoz et al. (2002a) em búfalas da raça Murrah, de 6,28 - 8,38% na gordura, de 4,05 - 4,59% na proteína, de 4,96 - 5,34% na lactose e de 16,94 - 18,55% nos sólidos totais. Khan et al. (2011) relataram alguns percentuais em búfalos oriundos do Paquistão: 7,47% para gordura, 5,24% para lactose e 3,31% para proteína.

Huhn et al. (1982), em estudo comparativo entre leite de bubalinos e leite de zebuínos, encontraram as seguintes diferenças: 43,81% mais sólidos totais, 43,60% mais gordura, 17,10% mais extrato seco desengordurado, 41,54% mais proteína e 2,41% mais lactose no leite bubalino.

O Brasil não possui uma legislação específica para a qualidade do leite bubalino. A IN nº 62/2011 estabelece os requisitos físicos e químicos para o leite cru bovino refrigerado comercializado no Brasil. Segundo a instrução normativa deverá ter um mínimo de 3% de gordura, 2,9% de proteínas e 8,4% de extrato seco desengordurado (MAPA, 2011).

2.3 Classificação das mastites

A mastite pode ter várias origens: fisiológica, traumática, térmica e infecciosa. Dentre estas, a infecciosa apresenta maior importância, sendo as bactérias as maiores indutoras deste processo inflamatório. Levando em consideração a origem do agente infeccioso e a forma de contaminação, classificam-se as mastites em contagiosas e ambientais (Ristow & Perez Júnior, 2008). A mastite contagiosa é provocada por micro-organismos adaptados a viver sobre a pele e mucosas do hospedeiro, portanto a sua transmissão ocorre durante a ordenha. Os principais agentes etiológicos são as espécies do gênero *Staphylococcus*, sendo *S. aureus* o mais patogênico (Siugzdaite et al., 2005). A mastite ambiental é provocada por micro-organismos que sobrevivem muito bem ou tem origem no meio ambiente, como água, dejetos, camas e solo. Um dos principais representantes é a *Escherichia coli* (White & Hinckley, 1999).

Quanto à sintomatologia ou intensidade da resposta inflamatória, a mastite pode ser classificada em clínica e subclínica (Brito & Brito, 1998). A mastite subclínica é

caracterizada pela ausência de manifestações o que dificulta o diagnóstico e permite que se mantenha por longos períodos no rebanho. Essa é a forma mais crítica da mastite, por provocar as maiores perdas econômicas, devido à diminuição da produção, redução da qualidade e perda dos benefícios da bonificação dos programas de pagamento do leite por qualidade (Fonseca & Santos, 2000). A mastite clínica apresenta várias classificações dependendo da intensidade da resposta inflamatória. Poderá ser classificada em superaguda, aguda, subaguda e crônica. A forma superaguda é caracterizada pela manifestação sistêmica, bem como pelo acentuado processo inflamatório instaurado na glândula. Na aguda, o envolvimento sistêmico está ausente, na subaguda percebe-se uma branda reação inflamatória na glândula e na crônica há substituição do tecido secretor por fibroso (Carlton & McGavin, 1998). Em todas as formas de mastite clínica, mudanças visíveis no aspecto do leite poderão estar presentes.

Alguns trabalhos utilizaram a indução da mastite em vacas para avaliar a resposta local e sistêmica desse processo inflamatório. Os principais patógenos utilizados foram *Escherichia coli* (Bannerman et al. 2004; Bannerman, Paape & Chockalingam, 2006; Petzl et al., 2008; Pezeshki et al., 2011) e *S. aureus* (Schukken et al., 1999; Shoshani et al., 2000; Bannerman et al., 2004; Almeida et al. 2005; Martins Filho, 2006; Atalla et al., 2009). Os experimentos relataram as alterações de composição do leite e os mais diferentes parâmetros no âmbito da resposta inflamatória, sejam clínicos ou imunológicos.

2.4 Importância da mastite

A mastite é um dos problemas sanitários encontrados nos bubalinos. Da mesma forma que nos bovinos e outras espécies exploradas comercialmente, provoca alteração na quantidade e qualidade do leite produzido, levando a uma baixa estabilidade e baixo rendimento industrial (Bansal et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Wickstrom et al., 2009; Le Maréchal et al., 2011 ; Mungatana et al., 2011). Ainda, acarreta problemas à saúde pública (Fagundes & Oliveira, 2004), afeta a vida reprodutiva (Hernandez et al., 2012) e o bem estar do animal afetado (Siivonen et al., 2011).

O método mais utilizado para detecção da mastite nas diferentes espécies animais é a contagem de células somáticas (CCS). A associação entre CCS, produtividade e qualidade do leite bovino (Hanus et al., 2010; Hand, Godkin & Kelton, 2012) e de seus derivados (Santos, 2002) fez com que determinados países estipulassem um limite de 400.000 CS/mL de leite cru refrigerado, como a União Européia (27 países), Nova Zelândia e Canadá

(Alberta Regulation, 1999; MAF, 2001; EC, 2004), apesar de estar comprovado que contagens de 100.000 CS/mL estão relacionadas com perda da qualidade do leite bovino (Auldist & Hubble, 1998). No Brasil, a IN nº 62/2011 que veio em substituição à IN 51/2002, estipula uma contagem máxima de 600.000 CS/mL em leite cru refrigerado bovino, devendo, a partir de 2014, alcançar a contagem de 500.000 CS/mL e em 2016, 400.000 CS/mL, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MAPA, 2011).

Trabalhos realizados com búfalas leiteiras registraram relação entre CCS e alteração na composição do leite. Contagens superiores a 400.000 CS/mL estavam relacionadas com significativas alterações na composição do leite (Piccinini et al., 2006). Tripaldi et al. (2010) relataram alterações de composição em contagens superiores a 200.000 CS/mL de leite.

Lopes (2009), acompanhando a lactação de 246 búfalas, encontrou influência negativa do aumento da CCS nas produções de leite e seus constituintes. Singh & Ludri (2001), também relataram uma correlação significativa entre CCS e produção/composição de leite, enquanto Jorge et al. (2005) e Barreto et al. (2010) não encontraram correlação entre CCS, produção de leite e porcentagens de proteína e gordura. Bastos (2004) e Bastos & Birgel (2011), analisando alguns parâmetros no leite de búfalas da raça Murrah, verificaram que o aumento da CCS implicou na diminuição significativa da lactose, porém, sem efeito significativo nos percentuais de gordura e proteína. Correlação negativa entre o aumento da CCS, produção de leite e teor de lactose foi detectada por Cerón-Muñoz et al. (2002).

Em bovinos, vários trabalhos relataram a associação entre CCS e qualidade do leite. Paape et al. (2000), Santos (2002) e Hanus et al. (2010), discutindo sobre o impacto da mastite bovina na composição do leite, relataram, seu efeito sobre a proteína, gordura e lactose, bem como sua ação sobre as atividades enzimáticas desta secreção. Ogola, Shitandi & Nanua (2007) descreveram que leite de vacas com contagens superiores a 500.000 CS/mL apresentaram elevação nos percentuais de sódio e cloro e diminuição significativa de caseína e lactose. A proteólise da caseína foi relacionada com presença de proteinases oriundas de leucócitos (Verdi et al., 1987; Napoli et al., 2007), como N-acetil-D-glucosamidase, beta-glucuronidase, catalase (Pyörälä, 2003), elastase e catepsinas (Larsen et al., 1996; Wedholm et al., 2008). Essas enzimas provocaram ainda danos em células epiteliais da glândula e podem ser ferramentas na indicação da mastite (Kitchen et al., 1984). Gargouri, Hamed & El Feki (2008) relataram a associação entre contagem de polimorfonucleares e o grau de lipólise no leite, possivelmente provocada pelas enzimas provenientes dessa célula de defesa. Santos, (2002) citou vários autores que descreveram o efeito da CCS do leite bovino sobre a

qualidade de derivados lácteos, como, alteração no rendimento e na qualidade do queijo produzido, estabilidade térmica e reduzida vida de prateleira do leite em pó, qualidade organoléptica reduzida da manteiga e inibição da multiplicação dos micro-organismos utilizados na fabricação de iogurte.

Hand, Godkin & Kelton (2012) analisaram a relação entre CCS, número de lactações, produtividade da glândula e diminuição de produção/quarto/dia. Concluíram que a menor queda de produção ocorreu em primíparas de baixa produtividade. Nessas, os pesquisadores encontraram, em contagens de 200.000 CS/mL uma redução de 1,44% e em contagens de 2.000.000, redução de 6,23% na produção de leite. Tesfaye, Regassa & Kelay (2010), descreveram percentuais de queda de produção de leite bovino, na mastite subclínica de 25%, 33% e 48%, respectivamente para resultados no CMT de 1+, 2+ e 3+. Akers & Nickerson (2011) relataram que um único quarto infectado durante a lactação pode provocar uma redução na produção de leite de 10 a 12%.

A mastite subclínica em bovinos foi responsável, em 2008, por uma perda de 17% do volume total de produção leiteira no Brasil. Isto representou cerca de 4,6 bilhões de litros, ou aproximadamente, R\$ 2,3 bilhões (Cassol et al., 2010).

Trabalho realizado no intuito de verificar os custos da mastite clínica, revelou que 41% dos custos se deve à perda de leite produzido, 31% por serviços veterinários e uso de fármacos, 23% ao leite descartado e 5% ao excesso de trabalho (Heikkilä, Nousiainen & Pyörälä, 2012). Segundo Huijps, Lam & Hogeveen (2008), 36% das perdas econômicas da mastite clínica se referem à diminuição de produção, enquanto na mastite subclínica esse percentual chega a 100%. Hogeveen, Huijps & Lam (2011) citaram que além dos pontos anteriormente abordados, participam dos custos o diagnóstico, decréscimo na qualidade do leite, aumento do risco de descarte animal e o material utilizado no controle e prevenção.

Somam-se aos problemas anteriormente relatados o consumo de produtos lácteos com presença de resíduos antimicrobianos, que podem acarretar sérios riscos à saúde pública (Souza, 2005; Raia Júnior, 2006) e a presença de enterotoxinas termoestáveis no leite (Fagundes & Oliveira, 2004; Oliveira et al., 2011a). Sabe-se que um dos principais agentes etiológicos da mastite é o *S. aureus* e segundo Cardoso, Carmo & Silva (2000), 30 a 50% das cepas são capazes de produzir uma ou mais enterotoxinas.

2.5 A mastite em bubalinos e bovinos

Apesar das búfalas serem historicamente consideradas mais resistentes à mastite, relatos mostraram diferentes índices nas várias regiões onde a espécie está distribuída e estes variam de 3% a 69%. Entre os agentes etiológicos encontrados, destacam-se as bactérias Gram positivas, representadas pelos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Sá et al. (2004) e Li et al. (2009) comentaram que embora a mastite possa ser provocada por inúmeros agentes, o gênero *Staphylococcus* é reconhecido como o agente isolado com maior frequência de casos de mastite, nas diferentes espécies animais e em diversos países do mundo.

Vianni & Nader Filho (1990) relataram uma prevalência de mastite em búfalas, no Brasil, de 8,81%. Costa et al. (1997) encontraram diferentes percentuais de mastite em búfalas do Vale do Ribeira e Sorocaba, Estado de São Paulo, conforme o período de lactação (42,25%, 33,34% e 20,31%, no início, meio e fim da lactação, respectivamente). Levantamento realizado por Kapronezai et al. (2005) indicou o *S. aureus* como o patógeno mais encontrado em fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo, seguido por *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. Trabalho realizado em um rebanho bubalino do Distrito Federal detectou pelo CMT, 3% de mastite subclínica (Lazzari et al., 2002).

Índices de mastite bubalina foram descritos em vários países do mundo. No Nepal, Subedi & Dhakal (2002) encontraram 27% de mastite clínica. Neste país, Dhakal (2006) encontrou em 60 animais clinicamente normais, de cinco propriedades, 21,7% das búfalas e 8% dos quartos mamários com mastite subclínica. Um trabalho realizado por Khan & Muhammad (2005) no Paquistão, revelou 27% de mastite subclínica e 4% de mastite clínica em búfalas leiteiras. As principais bactérias isoladas foram *S. aureus* (45%), *Streptococcus agalactiae* (23%), *Escherichia coli* (18%) e *Bacillus* spp. (14%). No Irã, levantamento descrito por Reza et al. (2011), mostrou 13,87% dos quartos mamários e 23,66% das búfalas, com mastite subclínica.

Özenç et al. (2008) relataram altos índices de mastite bubalina na Turquia. Cerca de 36,5% dos quartos mamários e 69,1% dos animais estavam com infecção. Os agentes mais encontrados foram *Candida* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo e *S. aureus*. Na Itália, Moroni et al. (2006) detectaram infecção em 63% dos quartos mamários avaliados, com isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativos, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus faecalis*.

Mastite aguda detectada em 56 búfalas do Egito revelou como patógenos responsáveis os coliformes, *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* (El-Khodery & Osman, 2008). Na Índia, os principais agentes causadores da mastite bubalina foram *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (Kumar, 2009; Yadav & Kumar, 2011). Em búfalas da raça Murrah criadas na Índia foi detectada uma incidência de mastite de 18,91%, com grandes produtoras apresentando o índice significativamente mais elevado (Khate & Yadav, 2010).

A mastite bovina é amplamente relatada no Brasil e no mundo, com variados percentuais e patógenos. No Brasil, percebe-se uma prevalência de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo. Estes agentes representaram 43,1% dos isolamentos realizados por Reis, Silva e Brescia (2003) no Estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do Brasil (Zoccal & Stock, 2011).

No Pará, trabalho recente detectou 6,6% de mastite subclínica e 1,3% de mastite clínica em vacas leiteiras. Houve prevalência do *Staphylococcus* coagulase negativo, seguido do *S. aureus* (Oliveira et al., 2011). Barbalho & Mota (2001) descreveram em Pernambuco a prevalência destes agentes. Pereira (2007) encontrou no Estado de Minas Gerais índices muito mais preocupantes de mastite subclínica (18,63% a 89,70%).

Nota-se uma semelhança muito grande entre os agentes etiológicos isolados de casos de mastite bovina no Brasil e no mundo. Isso pode ser percebido pelo levantamento realizado por Fadlilmoula et al. (2007) na Alemanha, que revelou *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo como os patógenos contagiosos mais prevalentes em vacas leiteiras. Resultado semelhante, em relação à etiologia, foi encontrado em estudo seccional transversal realizado na Etiópia com 302 vacas em lactação. Detectou-se 3% de mastite clínica e 25,2% de mastite subclínica, onde os principais agentes isolados foram *Staphylococcus* coagulase negativos, *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Bitew, Tafere & Tolosa, 2010).

Estudo retrospectivo realizado no sul da China, entre 2005 e 2009, revelou um percentual de mastite clínica em bovinos de 8,7% e subclínica de 48,8%. Nas duas situações o agente etiológico isolado com maior frequência foi *S. aureus* (Yang et al., 2011). Na Índia foi detectada uma prevalência de 56,1% de mastite subclínica tendo como principais agentes etiológicos o gênero *Staphylococcus* spp. seguido de *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli* (Bhikane et al., 2011).

2.6 Imunidade da glândula mamária

Tolerância e resistência são duas estratégias distintas que conferem aos animais a capacidade de combater o patógeno (Detilleux, 2011). Estas estratégias estão presentes na glândula mamária, representadas pela imunidade inata (primeira e segunda linhas de defesa) e imunidade adquirida (terceira linha de defesa) (Vaz, 2004 e Rainard & Riollet, 2006).

A barreira física, composta por várias estruturas e substâncias, pertence a primeira linha de defesa, e a pele, uma das primeiras barreiras, deverá estar íntegra para dificultar a colonização de patógenos (Tizard, 2008). Segundo Uppal et al. (1994) apud Amaral & Escrivão (2005) a maior concentração de pigmentos de melanina na pele das búfalas confere proteção contra irritações por injúrias ambientais.

O canal da teta é uma importante estrutura da primeira linha de defesa (Carneiro, Domingues & Vaz, 2009). Normalmente encontra-se fechado pelo esfíncter muscular e queratina que adsorve as bactérias e descama quando coberto por elas (Hillerton, 1996). O epitélio estratificado queratinoso é mais espesso nas búfalas, facilitando a descamação e eliminação bacteriana (Uppal et al., 1994 apud Amaral e Escrivão, 2005). Comparando o canal das tetas de vacas e búfalas, percebe-se que a primeira espécie apresenta canais de menor comprimento e menor densidade (Seykora & MacDaniel, 1985), porém, segundo Uppal et al. (1994) apud Amaral e Escrivão, (2005) essa diferença não é significativa, não sendo portanto responsável por uma suposta resistência mais elevada das búfalas. Estes autores citaram outras características do canal da teta das búfalas que poderiam estar relacionadas à prevenção de infecções, como o maior número de músculos, fibras e vasos sanguíneos e a presença de um esfíncter mais desenvolvido. Ainda, nessa estrutura, existem ácidos graxos e proteínas catiônicas que possuem capacidade bactericida ou bacteriostática. O potencial de destruição depende do tipo de ácidos e proteínas encontradas (Hogan et al., 1988).

Vacas e búfalas apresentam, compondo o sistema do canal da teta, a roseta de “Fürstenberg”, estrutura composta por várias pregas que possui a função de evitar infecções, pela presença de linfócitos, monócitos, polimorfonucleares e agregações de tecido linforeticular, sítio de produção de anticorpos (Carlton & McGavin, 1998).

A segunda linha de proteção da glândula mamária são os mecanismos químicos (fatores solúveis) e celulares (Tizard, 2008). Os fatores solúveis são compostos pelo sistema complemento, lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, citocinas (Linde et al., 2008) e peptídeos antimicrobianos (defensinas-beta) (Das et al., 2009).

O sistema complemento é um conjunto de proteínas com importante papel na defesa do organismo. Pode ser ativado na presença (via clássica) ou ausência de anticorpos (via alternativa). Em casos de infecção da glândula mamária o sistema complemento é ativado pela via alternativa que provocará a deposição de componentes responsáveis pela opsonização, produção de mediadores pró-inflamatórios e aumento da permeabilidade vascular (Rainard & Poutrel, 2000; Tizard, 2008).

A lactoferrina é uma glicoproteína com efeito bacteriostático por quelar o ferro dificultando o crescimento bacteriano. É liberada por exocitose de neutrófilos e também está presente em macrófagos e células epiteliais da glândula mamária (Oviedo-Boyso et al., 2007). Segundo Franciscis & Dipalo (1994) e Bhatia & Valsa (1994), o leite de búfalas apresenta maiores concentrações de lactoferrina, o que provocaria uma maior indisponibilidade de ferro para o crescimento bacteriano.

A lactoperoxidase, outro fator solúvel encontrado no leite, tem a função de provocar a peroxidação do tiocianato (com peróxido de hidrogênio) produzindo substâncias que interferem na multiplicação dos invasores (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000). De acordo com Kumar & Bathia (1994), o leite das búfalas apresenta 23% mais lactoperoxidase que o leite de vacas.

A lisozima, proteína bactericida encontrada em vários sítios do hospedeiro, tem a capacidade de destruir as ligações β ,1-4 entre NAM e NAG, açúcares encontrados na composição do peptidoglicano, principal componente da parede de bactérias Gram positivas (Hirsh & Zee, 1999). Na glândula mamária, esta proteína é produzida pelas células epiteliais e por leucócitos (Rainard & Riollet, 2006), e segundo Priyadarshini & Kansal (2002), a concentração de lisozima no leite de búfalas é maior que no de vacas e cabras (Sahoo, More & Singh, 2006).

Defensinas-beta são peptídeos encontrados no tecido mamário bubalino que apresentam homologia com o peptídeo antimicrobiano lingual de bovinos. Possuem atividade antimicrobiana e antiviral e comprovadamente apresentam concentração aumentada em casos naturais de mastite (Das et al. 2009).

Araújo & Gheller (2005), em uma ampla revisão sobre os mais variados aspectos relacionados à imunidade da glândula mamária de búfalas, citaram que as citocinas possuem o importante papel de regular a resposta imune no intuito de destruir patógenos colonizadores.

Gouon-Evans, Lin & Pollard (2002), Roitt & Delves (2004) e Watson, Oliver & Khaled (2011), descreveram as citocinas como proteínas que medeiam o crescimento

celular, inflamação, imunidade, diferenciação, migração e reparo. São proteínas de baixo peso molecular, produzidas de maneira transitória, são rapidamente degradadas e, portanto, com a meia-vida curta (Mingala et al. 2007). Nas respostas imunes inatas, as citocinas são produzidas por macrófagos e células *Natural Killer* (NK) e nas respostas imunes adaptativas, principalmente pelos linfócitos T. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para a utilização destas moléculas no diagnóstico e na imunoterapia da mastite (Alluwaimi, 2004; Sarikaya et al., 2006; Sakemi, Tamura & Hagiwara, 2011).

As citocinas estudadas na fisiopatologia da glândula mamária são as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α). Estas citocinas são produzidas principalmente pelas células epiteliais e pelos macrófagos e desencadeiam o processo inflamatório por alteração na permeabilidade vascular. Promovem o recrutamento de leucócitos, estimulam as células endoteliais locais a expressarem adesinas aos neutrófilos, induzindo-os a se infiltrar no tecido mamário (Sordillo, Shafer-Weaver & Derosa, 1997). Elas já foram avaliadas tanto em casos naturais de mastite, por detecção da própria citocina (Compton et al., 2009; Wenz et al., 2010) ou pela pesquisa do RNAm específico (Nagahata et al., 2011) como em induções do processo inflamatório na glândula mamária (Simojoki et al., 2011).

A IL-1 β , uma das citocinas pró-inflamatórias mais estudadas no tecido glandular mamário, tem como células fonte monócitos, células dendríticas, células B, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, astrócitos e macrófagos e como principais células-alvo, timócitos, neutrófilos, células B e T e células teciduais. Ela provoca uma resposta local, pela migração transepitelial de neutrófilos, e sistêmica, por ser uma potente indutora da febre (Abbas & Lichtman, 2007).

De acordo com Bannerman et al. (2004), *S. aureus*, após inoculação intramamária em vacas, produz aumento nos níveis de IL-1 β e várias outras citocinas. A IL-1 β surgiu no leite 16 horas pós-inoculação e foi detectada até 48 horas pós-indução da mastite. Segundo Günter et al. (2011), apesar do *S. aureus* induzir aumento da IL-1 β , ela tem baixo efeito regulatório sobre esta importante citocina pró-inflamatória, quando comparada à *Escherichia coli*. Aumento nos níveis de citocinas também foi percebida pós-inoculação de *Staphylococcus coagulase negativos* (*simulans* e *epidermidis*), com diferença de intensidade na resposta imune inata (Simojoki et al., 2011). Wenz et al. (2010) relataram que em casos naturais de mastite clínica a IL-1 β estava mais relacionada a processos inflamatórios provocados por bactérias Gram negativas.

Além dos fatores solúveis acima descritos, existe a defesa celular da imunidade inata na glândula mamária, as células somáticas do leite (Sordillo, Shafer-Weaver & Derosa, 1997). As células somáticas do leite são representadas pelos leucócitos e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna da teta (Galiero & Morena, 2000). A CCS pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles, número de partos, período de lactação, mês e estação do ano (Harmon, 1994) e segundo Brand et al. (2011) o escore de células somáticas parece ser definido também por diferenças genéticas que podem ser avaliadas a partir da análise de células da glândula mamária. Apesar de ser influenciada por vários fatores, a elevação da CCS é uma resposta modulada por mediadores da inflamação, sendo que o principal fator envolvido é o *status* de infecção (Amaral et al., 2005). Segundo Philpot (1998), as células somáticas possuem dois papéis importantes, combater o micro-organismo causador da doença e reparar os tecidos secretores danificados pela infecção.

De acordo com Dhakal, Kapur & Anshu (1992), as células que predominam no leite de uma glândula hígida são as células epiteliais (48,42%), seguidas de linfócitos (29,28%), neutrófilos (20,98%) e macrófagos (1,62%). Harmon, (1994) e Sordillo, Shafer-Weaver & Derosa (1997) afirmaram que macrófagos (54-83%) e linfócitos (10-27%) estão em maior concentração no leite da glândula mamária bovina livre de mastite, e os neutrófilos em menor número (0-11%). Carlton & McGavin (1998) e Pyörälä (2003) compartilharam da mesma opinião, afirmando que em uma glândula mamária saudável há o predomínio de macrófagos. Dang et al. (2010), avaliando tipos celulares e atividade fagocítica nas diferentes fases de lactação das búfalas, encontraram baixa contagem de neutrófilos no leite no início da lactação que aumentou significativamente ao longo do período e um comportamento inverso para os linfócitos. A maior atividade fagocítica foi detectada no período médio da lactação das búfalas. Daley et al. (1991) descreveram que em quartos mamários de vacas, infectados com *S. aureus*, existe uma variação quantitativa e qualitativa de polimorfonucleares durante o curso da infecção, representados pela CCS e pela habilidade fagocítica e bactericida dessa célula de defesa.

Substâncias químicas liberadas na destruição do tecido secretor e fatores de virulência do patógeno induzem o aporte de leucócitos do sangue para a glândula mamária. Em uma glândula infectada, os neutrófilos encontram-se em maior número (Paape et al., 1979; Paape et al., 2002; Tripaldi et al., 2010). Os linfócitos representam 20-40% das células de defesas presentes no leite da glândula com mastite e o restante é representado por

macrófagos e células do epitélio descamado (2-25%) (Daniel et al., 1991; Ribas, Paula & Andrade, 2002).

Existem vários métodos para a mensuração de células somáticas do leite, como CMT (*California Mastitis Test*), WMT (*Wisconsin Mastitis Test*), contagem eletrônica e contagem microscópica, considerado o método de referência (Radostitis, Leslie & Fetrow, 1994; Fonseca & Santos, 2000; Bhutto, Murray & Woldehiwet, 2012). A contagem eletrônica apresenta como grande vantagem sobre a contagem microscópica, a rapidez e o número de amostras analisadas por hora. Alguns pesquisadores já relataram a equivalência entre os dois métodos, Arcuri et al. (2004) em cabras, Silveira et al. (2005) em bovinos e Almeida (2008), em humanos. Della Libera et al. (2004) detectaram no leite de búfalas hígdas, medianas de CCS de 13.000 pela determinação eletrônica e 18.000 pela determinação microscópica.

Segundo National Mastitis Council (1996) apud Arcuri et al. (2004), no leite de vacas livres de infecção intramamária encontram-se até 200.000 células somáticas/mL. Singh & Ludri (2001) encontraram variação na contagem de células somáticas no leite de búfalas hígdas conforme a época do ano (76.000 a 135.000 CS/mL). Levantamento conduzido por Dhakal, Neupane & Nagahata (2008), revelaram contagens de 171×10^3 em glândulas normais, 799×10^3 em mastite subclínica e 6.039×10^3 em mastite clínica de búfalas. Tripaldi et al. (2010), afirmaram que a contagem de 200×10^3 CS/mL de leite de búfala pode ser utilizada como o limiar entre uma glândula mamária saudável e uma com mastite subclínica. Medeiros et al. (2011a), em pesquisa realizada para avaliar os fatores de risco associados com a mastite bubalina, consideraram uma glândula mamária hígdida aquela com até 400.000 CS/mL de leite.

Carvalho et al. (2007), detectaram no leite de búfalas, com média de CCS variando de 12.840/mL a 149.680/mL, infecção por diversos patógenos. Os maiores valores de CCS foram encontrados na presença de patógenos ambientais. Neste mesmo trabalho foi detectada uma média de 45.000 CS/mL em amostras de leite com patógenos contagiosos (*S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*). Ao contrário, Tripaldi et al. (2010) encontraram somente 1% de amostras com baixa CCS, positivas no exame bacteriológico.

Kapronezai (2004) relatou que búfalas com resultado positivo no exame microbiológico do leite não apresentavam processo inflamatório detectável. Corroborando com este achado, Lazzari et al. (2004), citaram que bactérias com isolamento significativo no leite de búfalas não foram capazes de induzir uma resposta celular detectável ao CMT. Guido et al. (1994) encontraram índices significativos de infecção intramamária em animais com baixas contagens de células somáticas.

Trabalho desenvolvido por Carvalho et al. (2007) indicou que o CMT não é um bom teste para detecção de mastite subclínica em bubalinos. Amaral et al. (2005) chamaram atenção aos valores diminutos de células somáticas no leite de búfalas quando comparados com o leite de bovinos. Porém Jorge et al. (2005), encontraram correlação entre contagem eletrônica de células somáticas e CMT e Moroni et al. (2006), encontraram uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 99,1% entre contagem eletrônica de células somáticas e cultura. Cem por cento dos quartos mamários com contagens acima de 200.000 apresentavam infecção intramamária. Resultado semelhante foi verificado por Dhakal (2006). Medeiros et al. (2011), avaliando búfalas da Região Nordeste do Brasil, observaram que as amostras de leite positivas no exame microbiológico apresentaram CCS entre 280.000 e 401.000 cel/mL. Reza et al. (2011) descreveram uma sensibilidade do CMT para bubalinos de 70% na detecção de patógenos maiores da mastite.

Segundo Cerón-Muñoz et al. (2002), testes para detecção de mastite devem ser ajustados para rebanhos bubalinos na intenção de melhorar a qualidade higiênica do leite, assim como promover a qualidade dos produtos lácteos oferecidos no mercado.

A imunidade inata ou inespecífica não aumenta pela exposição repetida ao mesmo agente etiológico, ao contrário da adquirida, também denominada adaptativa ou específica. Esta imunidade fornece uma defesa máxima do organismo quando em contato pela segunda vez com o mesmo agressor. Ela é composta por dois ramos, a mediada por anticorpos (resposta imune-humoral) e a mediada por células (resposta imune-celular) (Tizard, 2008).

Na glândula mamária, a imunidade específica é representada basicamente pela resposta humoral, composta por imunoglobulinas do tipo A (IgA) e do tipo G1 (IgG1). Segundo Roitt & Delves (2004), Abbas & Lichtman (2007) e Tizard (2008) as imunoglobulinas apresentam funções variadas, como opsonização, neutralização, aglutinação e ativação do sistema complemento. A IgA é sintetizada por plasmócitos presentes no tecido mamário enquanto a IgG1, predominante na secreção láctea de ruminantes, é sintetizada e secretada por plasmócitos no baço, linfonodos e medula óssea e alcança o tecido glandular através do soro sanguíneo (Tizard, 2008).

2.7 Fatores de virulência e patogenia da mastite por *S. aureus*

O *S. aureus* é considerado um dos principais agentes etiológicos da mastite. É um coco Gram positivo, portador de vários fatores de virulência, alguns relacionados com os mecanismos de evasão da bactéria (cápsula polissacarídica, biofilme, toxinas bi-componentes,

proteína A, coagulase, catalase e proteases), outros responsáveis pelos danos ao tecido do hospedeiro (toxinas alfa, beta e delta), colonização e invasão dos tecidos (estafiloquinase, biofilme, lipase, cápsula polissacarídica, proteínas de ligação e hialuronidase) e indutores/moduladores da resposta inflamatória (peptidoglicano, ácido lipoteicóico, ácido teicóico, lipoproteínas e toxinas superantigênicas, como as enterotoxinas (SEs) e a toxina da síndrome do choque tóxico – TSST-1) (Quinn et al., 1994; Hirsh & Zee, 1999; Reed et al., 2001; Karlsson & Arvidson, 2002; Rainard et al., 2008; Gyles et al., 2010; Kim et al., 2011a; Ote et al., 2011). Le Maréchal et al. (2011a) descreveram uma grande variação nos fatores de virulência presentes em cepas de *S. aureus* isoladas de casos graves (gangrenosa fatal) e brandos (subclínica) de mastite. Leeuwen et al. (2005) e Contreras & Rodríguez (2011) citaram como exemplo, isolados capazes de produzir superantígenos, indutores de uma resposta por citocinas pró-inflamatórias e normalmente relacionados com casos de mastite gangrenosa.

A cápsula, presente em algumas cepas de *S. aureus*, é composta de polissacarídeos. É uma estrutura estável, intimamente associada à célula bacteriana, que a protege da desidratação, de materiais tóxicos do ambiente e auxilia na aderência a células eucariontes e superfícies mucosas. Dificulta a fagocitose, sendo um importante fator de evasão (Dego, Van Dijk & Nederbrag, 2002). Segundo Soell et al., (1995) a cápsula induz liberação de citocinas.

Além da cápsula, o *S. aureus* possui outros mecanismos de adesão, representados por proteínas de superfície que promovem aderência aos componentes do hospedeiro, como fibronectinas, lamininas e colágenos. Essas substâncias são glicoproteínas e proteínas que formam uma matriz extracelular na superfície do epitélio e endotélio que permitem a aderência da bactéria e a colonização das células do hospedeiro (Gyles et al., 2010).

A adesão de *S. aureus* ao epitélio glandular mamário é considerada a primeira etapa crítica na patogênese da mastite. Em cultura de células observou-se o papel de outro fator de virulência encontrado em algumas cepas de *S. aureus*, o biofilme. Essa observação *in vitro* forneceu evidências de seu possível papel na colonização da glândula mamária (Vasudevan et al., 2003). O biofilme é uma matriz de exopolissacarídeos que gera o agrupamento das bactérias em microcolônias conferindo a elas maior adesão (Arciola, Baldassarri & Montanaro, 2001). Este tipo de organização fornece proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência à antimicrobianos (Gilbert, Mc Bain & Rickard, 2003). O biofilme contribui na persistência

bacteriana em sítios infecciosos e em infecções crônicas, pois dificulta os mecanismos de defesa do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos (Cucarella et al., 2001).

Fatores de virulência relacionados com os processos de evasão, disseminação e de destruição tecidual são extremamente importantes na manutenção da bactéria, persistência nos tecidos e indução da inflamação. A produção desses fatores, em maior ou menor grau, confere às diferentes cepas, virulência variada. Dentre os fatores de evasão, cita-se a “proteína A”, presente em 80% das cepas de *S. aureus*, coagulase, catalase e toxinas bi-componentes (Trabulsi & Alterthum, 2005).

A “proteína A estafilocócica” está ancorada na parede celular. Essa proteína apresenta quatro ou cinco unidades repetidas (A-E) que possibilitam ligação a porção Fc de diferentes subclasses de IgG (Navarre & Schneewind, 1999). Essa proteína atua como fator de virulência, interferindo na opsonização e ingestão pelos leucócitos polimorfonucleares (Winn et al., 2008). Sua importância na mastite bovina foi demonstrada por Zecconi et al. (2006).

A enzima coagulase transforma a protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação da fibrina a partir do fibrinogênio, coagulando o plasma (Archer, 2000). Sabe-se que o coágulo produzido resulta no acúmulo de fibrina ao redor da bactéria, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesa (Palma, Haggar & Flock, 1999). Da mesma forma que a coagulase, a enzima catalase participa da evasão da bactéria. Ela é responsável por decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelas células fagocíticas, em água e oxigênio (McCord, Keele & Fridovich, 1971).

Algumas cepas de *Staphylococcus* spp. produzem toxinas compostas de duas proteínas de ações sinérgicas (toxinas bi-componentes), secretadas independentemente, denominadas de classe F (*Fast*) e classe S (*Slow*). As interações destas classes induzem uma rápida ativação e abertura dos canais de cálcio presentes nas membranas das células alvo, causando influxo de cátions na célula (Werner et al., 2002). Essas toxinas são sinergicamente tóxicas aos leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (Gravet et al., 1998).

Os fatores de virulência, descritos a seguir, são responsáveis pela persistência, disseminação, indução da resposta imune e lesão aos tecidos do hospedeiro.

Lipase é uma enzima produzida por algumas cepas de *Staphylococcus* spp., e sua contribuição na patogenia ainda não está totalmente esclarecida. Acredita-se que seja um fator determinante em infecções localizadas, como abscessos, sendo também sugerido que possam ser importantes na colonização e persistência de bactérias residentes na pele, possivelmente em termos de nutrição ou pela liberação de ácidos graxos (Longshaw et al., 2000).

Hialuronidase constitui uma família de enzimas que digerem o ácido hialurônico presente em boa parte da matriz extracelular do tecido conjuntivo, facilitando a disseminação do *Staphylococcus* spp. nos tecidos (Rossi, Ceccon & Krebs, 2005). Outro fator de virulência que participa na disseminação do *Staphylococcus* spp. é a estafiloquinase, que induz a transformação de plasminogênio em plasmina, responsável em degradar coágulos (Trabulsi & Alterthum, 2005).

Peptidoglicano, lipoproteínas, ácidos teicóicos e lipoteicóicos são moléculas que integram a parede celular do *Staphylococcus* spp. e contribuem para a patogenicidade por meio da ativação da via alternativa do complemento e estimulação da produção de citocinas (Trabulsi & Alterthum, 2005; Kim et al., 2011a). Estes componentes da parede são padrões moleculares associados ao patógeno em bactérias Gram positivas (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*), reconhecidos pelo sistema imune inato, sem necessidade de um contato prévio (Aderem & Ulevitch, 2000). Estes padrões moleculares são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *pattern recognition receptors*) presentes sobre a superfície de células fagocíticas (Roitt & Delves, 2004). Ainda, como responsáveis pela indução/modulação da resposta inflamatória, pode-se citar as toxinas superantigênicas, representadas pelas SEs e a TSST-1. Elas provocam estimulação dos linfócitos T para liberação de citocinas pró-inflamatórias, que conforme a intensidade podem acarretar no choque tóxico (Trabulsi & Alterthum, 2005). Estas toxinas superantigênicas foram pesquisadas recentemente em cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina e bubalina (Ikawaty et al., 2010; Rahimi & Safai, 2010; Kumar et al., 2011; Günaydm, Aslantas & Demir, 2011; Ote et al., 2011; Shingh, Kumar & Yadav, 2011) . Os autores chamaram atenção da importância do achado dessas moléculas no âmbito da saúde pública.

Algumas toxinas parecem ser importantes na patogenia da mastite por *S. aureus*, entre elas, alfa, beta e delta toxinas, todas com ação sobre membranas celulares. A alfa-toxina age formando poros na membrana de vários tipos celulares. O principal efeito patogênico é o dano celular endotelial, levando ao comprometimento da micro-circulação. Provoca vários efeitos sobre o hospedeiro, principalmente desequilíbrio osmótico celular devido à perda de íons pelos poros formados (Bhakdi & Tranum, 1991). A beta-toxina, também denominada esfingomielinase D, age na esfingomielina das membranas celulares e tem sua ação potencializada pela delta-toxina, um peptídeo formado por 26 aminoácidos. Bernheimer & Rudy (1986) sugerem que essa última toxina teria propriedade surfactante ou formadora de canais. Gyles et al. (2010) citaram que a delta-toxina pode apresentar efeitos

diretos ou indiretos na ativação de neutrófilos e monócitos e apresentar uma atividade pró-inflamatória.

A patogenia do *S. aureus* depende dos fatores de virulência anteriormente descritos. Mastite clínica ou subclínica poderá ser provocada, dependendo da dose infectante, virulência da bactéria e resistência do hospedeiro. De uma forma geral, o *S. aureus* coloniza a pele, o canal da teta ou o interior da glândula mamária, principalmente quando os tecidos estão danificados (Fonseca & Santos, 2000). A transmissão da bactéria pode ocorrer através de fômites, como equipamentos utilizados na ordenha, mãos do ordenhador, panos ou esponjas (Timoney et al., 1988). Os micro-organismos passam pelo canal da teta, alcançam a cisterna e posteriormente aderem ao tecido secretor (Akers & Nickerson, 2011). Durante a multiplicação, são produzidas substâncias citotóxicas que fazem com que a glândula seja invadida por neutrófilos. O recrutamento dos neutrófilos ocorre pela produção de interleucina que induz a formação do ácido araquidônico, substrato da prostaglandina e leucotrienos, potentes agentes quimiotáticos para neutrófilos (Carlton & McGavin, 1998). Este aumento exagerado de neutrófilos provoca formação de coágulos lácteos e edema interalveolar. Com a presença maciça de neutrófilos e *S. aureus*, os lóbulos tornam-se obstruídos e começam a involuir. Onde há intensa multiplicação do micro-organismo pode ocorrer formação de abscessos (Gyles et al., 2010) que podem ser multifocais, de variados tamanhos e com possibilidade de coalescência (Carlton & McGavin, 1998). As substâncias citotóxicas responsáveis pelo aumento do aporte de leucócitos para a glândula também danificam o tecido mamário, com redução e alteração na concentração dos componentes sintetizados e diminuição da função secretória (Coulon et al., 2002; Bruckmaier, Ohtsouka & Blum, 2004). Esses eventos são precedidos pelo aumento da permeabilidade vascular, que inicialmente permite a passagem de proteínas de baixo peso molecular e posteriormente de leucócitos (Raulo et al., 2002).

Normalmente a mastite por *S. aureus* é subclínica, porém, pode provocar uma mastite gangrenosa superaguda que acomete principalmente novilhas de primeira cria, em início de lactação, o que resulta na diminuição de tecido mamário. A alfa toxina tem grande importância no aparecimento da gangrena, pois causa danos nos vasos sanguíneos levando a necrose coagulativa isquêmica de todo tecido adjacente (Timoney et al., 1988). Esta toxina tem capacidade de causar necrose em pequenos vasos e provocar o aparecimento de poros, o que altera a permeabilidade da membrana celular (Butt et al., 1998; Dinges, Orwing & Schlievert, 2000).

O *S. aureus* tem uma importante característica que é sua capacidade invasiva. Tem propriedades que permitem que se instale em camadas profundas da glândula mamária, onde há formação de tecido fibroso no foco de infecção. Isso impede a penetração de antimicrobianos e reflete na forma de infecção, que é de longa duração, tendendo a cronicidade e com baixíssima taxa de cura (Fonseca & Santos, 2000). Segundo Bayles et al. (1998) e Boulanger, Bereau & Lekeux (2006), a persistência da bactéria no foco de infecção provocando casos crônicos da enfermidade é parcialmente explicada pela capacidade que o *S. aureus* tem, de invadir linhas celulares do epitélio mamário (invasão em células não fagocíticas) e induzir apoptose, após escapar do endossoma ou persistir dentro das células como subpopulações que crescem lentamente. Essa característica associada a possibilidade de necrose do tecido glandular pode explicar parte do decréscimo na produção e alteração da composição do leite. De uma forma geral, o dano do tecido glandular mamário, ocorre pela associação entre fatores da bactéria e reações imunes do hospedeiro (Zhao & Lacasse, 2008).

A análise do parênquima mamário de vacas com mastite por *S. aureus* revelou diminuição da área luminal e aumento do estroma e a observação do epitélio alveolar evidenciou um decréscimo no número de organelas associadas com a síntese e secreção do leite (Sordillo, Nickerson & Akers, 1989).

Segundo Günther et al. (2011) os achados clínicos, a longa persistência da bactéria no tecido mamário e o tipo de resposta inflamatória induzida pelo *S. aureus* estão relacionados à estimulação de citocinas específicas e a velocidade de produção de fatores bactericidas. Não só a espécie bacteriana, mas também as diferentes cepas influenciam esse resultado. Avaliação de escore de células somáticas e de sinais clínicos pós-indução de mastite em vacas, por diferentes cepas de *S. aureus*, e a resposta à determinadas citocinas, demonstraram resultados bastante diversos (Atalla et al., 2009; Kim et al., 2011).

Uma característica da bactéria dificulta o diagnóstico da mastite, a eliminação cíclica através da secreção láctea. Isto confere uma grande diferença na detecção do *S. aureus* entre as vacas e em um mesmo animal (Sears et al., 1990; Torres, Rajala-Schultz & DeGraves, 2009; Walker et al., 2010; Walker et al., 2011).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, n. 406, p. 782-787, 2000.

AKERS, R.M.; NICKERSON, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, n. 16, p. 275-289, 2011.

ALBERTA Regulation 139/1999, Dairy Industry Act, Dairy Industry Regulation. Queen's Printer. [1999]. Disponível em: <http://www.qp.alberta.ca/574.cfm?page=1999_139.cfm&leg_type=Regs&isbncln=9780779764358> Acesso em: 27 mar. 2012.

ALLUWAIMI, A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, n. 77, p. 211-222, 2004.

ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1-6, 2005.

ALMEIDA, S.D.S. **Contagem celular somática, bacteriana total e composição do leite humano**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 2008.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.

AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 111-117, 2005.

ARAUJO, D.K.G; GHELLER, V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

- ARCHER, G.L. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative staphylococci. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infections Diseases**. 8. ed. Churchill Livingstone: New York, 2000. 3.580p.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection on Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, p. 2151-2156, 2001.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, J.R.F. et al. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1497-1500, 2004.
- ATALLA, H.; GYLES, C.; WILKIE, B.; MALLARD, B. et al. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. **Veterinary Microbiology**, n.137, p. 326-334, 2009.
- AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, n. 53, p. 28-36, 1998.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; CHOCKALINGAM, A. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- α , β 1, and β 2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 309-315, 2006.
- BANSAL, B.K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N.T.; SINGH, K.B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 144-152, 2005.
- BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARRETO, M.L.J.; RANGEL, A.H.N.; ARAÚJO, V.M. et al. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 6, n. 2, p. 47-52, 2010.
- BASTOS, P.A.S. **Constituição físico-química, celular e microbiológica do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no Estado de São Paulo**. 2004. 128f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.
- BASTOS, P.A.S.; BIRGEL, E.H. Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV – SP**, v. 9, n. 3, p. 06-13, 2011.

- BAYLES, K.W.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and Immunity**, n. 66, p. 336-342, 1998.
- BERNHEIMER, A.W.; RUDY, B. Interactions between membranes and cytolytic peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 864, n. 1, p. 123-141, 1986.
- BHAKDI, S.; TRANUM, J.J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Review**, v. 55, n. 4, p. 733-751, 1991.
- BHATIA, K.L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo Milk. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...**São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 162-164, 1994.
- BHIKANE, A.U.; AWANDKAR, S.P.; HASE, P.B. et al. Prevalence, etiology and antibiogram of subclinical mastitis in crossbred cows. **Veterinary Practitioner**, v. 11, n. 2, p. 122-123, 2011.
- BHUTTO, A.L.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWET, Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, n. 92, p. 13-17, 2012.
- BITEW, M.; TAFERE, A.; TOLOSA, T. Study on bovine mastitis in dairy farms of Bahir Dar and its environs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 23, p. 2912-2917, 2010.
- BOULANGER, D.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Invasion intracellulaire des cellules non-phagocytaires par *Staphylococcus aureus*. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 150, n. 1, p. 27-42, 2006.
- BRAND, B.; HARTMANN, A.; REPSILBER, D. et al. Comparative expression profiling of *E. coli* and *S. aureus* inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. **Genetics Selection Evolution**, v. 43, n. 24, p. 1-17, 2011.
- BRAUN, P.G.; PREUSS, S.E. Nutritional composition and chemico-physical parameters of water buffalo milk and milk products in Germany. **Milchwissenschaft**, v. 63, n. 1, p. 70-72, 2008.
- BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Programa de controle das mastitis causadas por microorganismos contagiosos e do ambiente. **Embrapa Gado de Leite**, n. 71, 1998, 25p.
- BRUCKMAIER, R.M.; OHTSOUKA, E.; BLUM, C.E. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine**, n. 8, p. 283-290, 2004.
- BUTT, H. L.; DUNSTAN, R.H.; MCGREGOR, N.R. et al. An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. **Journal of Medical Microbiology**, n. 47, p. 577-584, 1998.

- CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina – 1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 52, p.7-10, 2000.
- CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2 ed., Porto Alegre: ArtMed, 1998. 672p.
- CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.
- CARVALHO, L.B. **Padrão de infecção intramamária em búfalas (*Bubalus bubalis*) da região do alto São Francisco-MG**. 2005. 37f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.
- CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.
- CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C. et al. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 1337-1342, 2003.
- CASSOL, D.M.; SANDOVAL, G.A.F.; PERÍCOLE, J.J. et al. Mastite bovina. **A Hora Veterinária**, n. 175, p. 10-14, 2010.
- CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 324, p. 8-10, 2002.
- CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. et al. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2885-2889, 2002a.
- COMPTON, C.W.R.; CURSONS, R.T.M.; BARNETT, C.M.E.; MCDUGALL, S. Expression of innate resistance factors in mammary secretion from periparturient dairy heifers and their association with subsequent infection status. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 127, p. 357-364, 2009.
- CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUES, J.M. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, n. 16, p. 339 – 356, 2011.
- COSTA, E.O.; GARINO, F.; WATANABE, E.T. et al. Evaluation of the CMT positivity and microbiological status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5, Caserta, Italy: 1997. **Proceedings...**Caserta: [s.n.], v. 1, p. 631-634, 1997.
- COULON, J.B.; GASQUI, P.; BARNOUIN, J. et al. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. **Animal Research**, n. 51, p. 383-393, 2002.

CRUDELI, G.A.; PATIÑO, E.M. Origem do búfalo e principais raças. In: JORGE, A.M. et al. **Produção de Búfalas de Leite**. FEPAF: Botucatu – SP, 2011, 181p.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J. et al. Bap a, *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, n. 183, p. 2888 – 2896, 2001.

DALEY, M.J.; OLDHAM, E.R.; WILLIAMS, T.J.; COYLE, P.A. Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 3, p. 474-479, 1991.

DANG, A.K.; MUKHERJEE, J.; KAPILA, S. et al. *In vitro* phagocytic activity of milk neutrophils during lactation cycle in Murrah buffaloes of different parity. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 6, p. 706-711, 2010.

DANIEL, L.R.; CHEW, B.P.; TANAKA, T.S.; TJOELKER, L.W. In vitro effects of β -carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. **Journal of Dairy Science**, n. 74, p. 911-915, 1991.

DAS, H; AHMED, S.U.; THAKURIA, D. et al. Lingual antimicrobial peptide expresses in buffalo mammary gland. **Animal Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2009.

DEGO, K.O.; VAN DIJK, J.E.; NEDERBRAG, T.H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. **A Review Veterinary**, n. 24, p. 181-198, 2002.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; KITAMURA, S.S. et al. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1087-1092, 2004.

DETILLEUX, J.C. Effectiveness analysis of resistance and tolerance to infection. **Genetics Selection Evolution**, v. 43, n. 9, p. 1 – 10, 2011.

DHAKAL, I.P.; KAPUR, M.P.; ANSHU, S. Significance of differential somatic cell counts in milk for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using foremilk and strippings milk. **Indian Journal of Animal Health**, v. 31, n. 1, p. 39-42, 1992.

DHAKAL, I. P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, n. 2, p. 81-86, 2006.

DHAKAL, I. P.; NEUPANE, M.; NAGAHATA, H. Evaluation of direct and indirect measures of quarter milk from crossbred buffaloes. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 5, p. 628-633, 2008.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 13, p. 16-34, 2000.

EC. Corrigendum to regulation n° 853/2004 of the European Parliament and of the council of 29 april 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal**

of the European Union. [2004]. Disponível em: <http://eur-ex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:EN:PDF>. Acesso em: 27 mar. 2012.

EL-KHODERI, S.A.; OSMAN, S.A. Acute coliform mastitis in buffaloes (*Bubalus bubalis*): clinical findings and treatment outcomes. **Tropical Health Production**, v. 40, n. 2, p. 93-99, 2008.

ESCRIVÃO, S.C.; GHELLER, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Avaliação clínica, ultrasonográfica e telescópica das papilas mamárias de búfalas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 25-29, 2008.

FADLELMOULA, A.A.; FAHR, R.D.; ANACKER, G.; SWALVE, H.H. The effect of management factors on somatic-cell counts and specific mastitis causing pathogens in large scale dairy units. **Research Journal of Animal and Veterinary Sciences**, n. 2, p. 24-27, 2007.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FAO (**Food and Agriculture Organization**), [2010]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FRANCISCIS, G.; DIPALO, R. Buffalo Milk production. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 137-145, 1994.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, n. 1, p. 26-27, 2000.

GARGOURI, A.; HAMED, H.; EL FEKI, A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with lipolysis. **Livestok Science**, n. 113, p. 274-279, 2008.

GILBERT, P.; MC BAIN, A.J.; RICKARD, A.H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 245-248, 2003.

GONZÁLES, F.H.D. Composição química do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. 21p.

GOUON-EVANS, V.; LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 4, p.155-164, 2002.

GRAVET, A.; COLIN, D.A.; KELLER, D.; GIRADOT, R. et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. **FEBS Letters**, n. 436, p. 202-208, 1998.

GUIDO, M.C.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; COSTA, E.O. Female bubaline mastitis etiology in Brazilian state of São Paulo, 1994. Disponível em: <http://www.mcguido.vet.br/mastite_bubalina.htm>. Acesso em: 22 set. 2008.

GÜNAYDM, B.; ASLANTAS, Ö; DEMIR, C. Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis. **Tropical Animal Health Production**, n. 43, p. 1633-1637, 2011.

GÜNTHER, J.; ESCH, K.; POSCHADEL, N. et al. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* – Specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 695-707, 2011.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell, 2010. 643p.

HAND, K.J.; GODKIN, A.; KELTON, D.F. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. **Journal of Dairy Science**, n. 95, p. 1358 – 1362, 2012.

HANUS, O.; SAMKOVÁ, E.; SPICKA, J. et al. Relationship between somatic cell count and lactose content in milk of various species of mammals. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 58, n. 2, p. 87-100, 2010.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, n. 77, p. 2103-2113, 1994.

HEIKKILÄ, A.M.; NOUSIAINEN, J.I.; PYÖRÄLÄ, S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. **Journal of Dairy Science**, n. 95, p. 139-150, 2012.

HERNANDEZ, J.A.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; SANTOS, J.E.P. Observed and expected combined effects of clinical mastitis and low body condition on pregnancy loss in dairy cows. **Theriogenology**, n. 77, p. 115-121, 2012.

HILLERTON, J.E. Controle da mastite bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, Juiz de Fora, 1996. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa. p. 6-21, 1996.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. California: Blackwell Science, 1999. 479p.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 249-259, 1988.

HOGEEVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. Economic aspects os mastitis: New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, n. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HUHN, S.; GUIMARÃES, M.C.F.; NASCIMENTO, C.N.B. et al. Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos. **Embrapa – CPATU**, Belém, 1982. 15p.

HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of Dairy Research**, n. 75, p. 113-120, 2008.

IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**), [2010]. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=74&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 06 jun.2012.

IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**), [2010a]. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=6>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

IKAWATY, R.; BROUWER, C.E.; DUIJKEREN, E. et al. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, v. 5, n. 2, p. 60-70, 2010.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B. et al. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KAPRONEZAI, J. Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/disponiveis/10/10134/tde-05052004-114642/>>. Acesso em: 22 set. 2008.

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N.R. Análise microbiológica, teste de tamis e California mastitis test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 179-183, 2005.

KARLSSON, A.; ARVIDSON, S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. **Infection Immunology**, n. 70, p. 4239-4246, 2002.

KHAN, A.Z.; MUHAMMAD, G. Quarter-wise comparative prevalence of mastitis in buffaloes and crossbreds cows. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 25, n. 1, p. 9-12, 2005.

KHAN, S.; QURESHI, M.S.; AHMED, I.; SHAH, S.M. Milk composition and yield changes with advancing pregnancy in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, n. 35, n. 6, p. 375-380, 2011.

KHATE, K.; YADAV, B.R. Incidence of mastitis in Sahiwal cattle and Murrah buffaloes of a closed organized herd. **Indian Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 467-469, 2010.

KIM, Y.; ATALLA, H.; MALLARD, B. et al. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Research**, v. 7, n. 51, p. 1-13, 2011.

- KIM, K.W.; IM, J.; JEON, J.H. et al. *Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NK- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 2011a.
- KITCHEN, B.J.; MIDDLETON, G.; KWEE, W.S.; ANDREWS, R.J. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAGase) levels in bulk herd milk. **Journal of Dairy Research**, n. 51, p. 227-232, 1984.
- KUMAR, R.; BATHIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1994, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 2009-2220, 1994.
- KUMAR, P.A. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of bubaline mastitis directly from mastitic milk samples of buffaloes. **Tropical Animal Health Production**, n. 41, p. 1643-1651, 2009.
- KUMAR, R.; YADAV, B.R.; ANAND, S.K.; SINGH, R.S. Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 27, p. 513-521, 2011.
- KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Lactoperoxidase: physicochemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **British Journal of Nutrition**, n. 84, p. 19-25, 2000.
- LARSEN, L.B.; BENFELDT, C.; RASMUSSEN, L.K.; PETERSEN, T.E. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation. **Journal of Dairy Research**, n. 63, p. 119- 130, 1996.
- LAZZARI, A.M.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.V.S. et al. Bubaline mastitis (*Bubalus bubalis*): comparison of California mastitis test (CMT) and Whiteside (WS) with microbiological isolation of milk, preliminary report. In: XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS: 2002. **Proceedings...** Hannover: [s.n.], 2002.
- LAZZARI, A.M.; OLIVEIRA, M.V.S.; FERRAZ, C.N. et al. Interferência da somatotropina (rBST) nos índices de mastite e no isolamento de bactérias aeróbicas e facultativas do leite de búfala da raça Murrah. In: VI CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA E XIV CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, Brasília, 2004. **Anais...** Brasília, 2004.
- LE MARÉCHAL, C.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LOIR, Y.L. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review. **Dairy Science & Technology**, n. 91, p. 247 – 282, 2011.
- LE MARÉCHAL, C.; SEYFFERT, N.; JARDIN, J. et al. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. **Plos ONE**, v. 6, n. 11, p. 1 – 10, 2011a.
- LEEUEWEN, W.B.V.; MELLES, D.C.; ALAIDAN, A. et al. Host- and Tissue-Specific Pathogenic Traits of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4584 - 4591, 2005.

LI, J.P.; ZHOU, H.J.; YUAN, L. et al. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 10, p. 753-760, 2009.

LINDE, A.; ROSS, C.R.; DAVIS, E.G. et al. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 247-265, 2008.

LONGSHAW, C. M.; FARRELL, A.M.; WRIGHT, J.D.; HOLANDA, K.T. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. **Microbiology**, n. 146, p. 1419-1427, 2000.

LOPES, F.A. **Caracterização da produtividade e da qualidade do leite de búfalas na Zona da Mata Sul de Pernambuco**. 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

MACEDO, M.P.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A. et al. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 30, n. 3. p. 1084-1088, 2001.

MAF. **Ministry of Agriculture and Forestry**. Food: Dairy & Plants. Circular number 69, Dairy Industry Regulations 1990, D115.1 Raw Milk Acceptance. Wellington, promulgated 19 sep. 2001. [2001]. Disponível em: <http://www.nzfsa.govt.nz/dairy/publications/standards/d115-1.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2012.

MAHMOOD, A.; USMAN, S. A comparative study on the physicochemical parameters of Milk samples collected from buffalo, cow, goat and sheep of Gujrat, Pakistan. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 12, p. 1192-1197, 2010.

MAPA (**Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**), [2011]. Disponível em: http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/1824_GED.pdf. Acesso em: 27 mar. 2012.

MARTINS FILHO, L.P. **Inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923) em vacas leiteiras: estudo clínico, laboratorial e terapêutico**. 2006, 74f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MARTINS FILHO, L.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CESCO, F.T.R.S. et al. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **ARS Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2007.

McCORD, J. M.; KEELE, B. B.; FRIDOVICH, I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, p. 1024-1027, 1971.

- MEDEIROS, E.S.; BARBOSA, S.B.P; JATOBÁ, R.B. et al. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 219-223, 2011.
- MEDEIROS, E.S.; DE FREITAS, M.F.L.; SAUKAS, T.N. et al. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 499-504, 2011a.
- MEDHAMMAR, E.; WIJESINHA-BETTONI, R.; STADLMAYR, B. et al. Composition of Milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 92, p. 445-474, 2011.
- MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F. et al. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, n. 120, p. 544-551, 2010.
- MINGALA, C.N.; ODBILEG, R.; KONNAI, S. et al. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of swamp type buffalo contrasting with other bubaline breeds. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n. 30, p. 119-131, 2007.
- MORONI, P.; ROSSI, C.S.; PISONI, G. et al. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, n. 89, p. 998-1003, 2006.
- MUNGATANA, N.K.; NGURE, R.M.; SHITANDI, A. et al. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 360-364, 2011.
- NAGAHATA, H.; KAWAI, H.; HIGUCHI, H. et al. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 7, p. 885-894, 2011.
- NAPOLI, A.; AIELLO, D.; DI DONNA, L. et al. Exploitation of endogenous protease activity in raw mastitic milk by MALDI-TOF/TOF. **Analytical Chemistry**, n. 79, p. 5942-5948, 2007.
- NAVARRE, W.W; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 63, p. 174-229, 1999.
- OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2007.
- OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.
- OLIVEIRA, L.; RODRIGUES, A.C.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from

milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 10, p. 1361-1368, 2011a.

OTE, I.; TAMINIAU, B.; DUPREZ, J.N. et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, n. 153, p. 285-292, 2011.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M. et al. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

ÖZENÇ E.; VURAL, M.R.; SEKER, E.; UCAR, M. An evaluation of subclinical mastitis during lactation in Anatolian buffaloes. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 32, n. 5, p. 359-368, 2008.

PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P.; GUIDRY, A.J.; PEARSON, R.E. Leukocytes – second line of defense against invading mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, n. 62, p. 135-153, 1979.

PAAPE, M.J.; DUENAS, M.I.; WETTEMANN, R.P.; DOUGLASS, L.W. Effects of intramammary infection and parity on calf weaning weight and milk quality in beef cows. **Journal Animal Science**, n. 78, p. 2508-2514, 2000.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PALMA, M.; HAGGAR, A.; FLOCK J. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **Journal of Bacteriology**, n. 181, p. 2840-2845, 1999.

PARK, C.S.; JACOBSON, N.L. Glândula mamária e lactação. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996. 856p.

PATIÑO, E.M. Factores que afectan las propiedades físicas y la composición química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes, Argentina. **Revista Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 21–25, 2004.

PEREIRA, U.P. Mastite subclínica bovina em rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, Botucatu: 2007. **Anais...** Botucatu: [S.N.], p. 92, 2007.

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J. et al. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, v. 39, n. 2, p. 1-23, 2008.

PEZENSKI, A.; STORDEUR, P.; WALLEMACQ, H. et al. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 42, n. 15, p. 2-10, 2011.

- PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, Curitiba: 1998. **Anais...** Curitiba: [S.N.], p. 28-35, 1998.
- PICCININI, R.; MIARELLI, M.; FERRI, B. et al. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. **Journal of Dairy Research**, n. 73, p. 129-133, 2006.
- PRIYADARSHINI, S.; KANSAL, V.K. Lysozyme activity in buffalo milk: Effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 6, p. 895-899, 2002.
- PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, n. 34, p. 565-578, 2003.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Europa: Wolf, 1994. 648p.
- RADOSTITIS, O.M.; LESLIE, K.E.; FETROW, J. Mastitis control in dairy heard. In: Radostitis, O.M.; Leslie, K.E.; Fetrow, J. **Herd Health Food Animal Production Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 229-276.
- RAHIMI, E; SAFAI, H.G. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. **Veterinary Microbiology**, n. 141, p. 393-394, 2010.
- RAIA JÚNIOR, R.B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- RAINARD, P.; POULTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 945-951, 2000.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.
- RAINARD, P.; FROMAGEAU, A.; CUNHA, P.; GILBERT, F.B. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 1-13, 2008.
- RAULO, S.M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, T. et al. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 85, p. 137-145, 2002.
- REED, S.B.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E. et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. **Infection Immunology**, n. 69, p. 1521-1527, 2001.

- REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
- REZA, V.H.; MEHRAN, F.M.; MAJID, M.S.; HAMID, M. Bacterial pathogens of intramammary infections in Azeri buffaloes of Iran and their antibiogram. **African Journal of Agriculture Research**, v. 6, n. 11, p. 2516-2521, 2011.
- RIBAS, N.P.; PAULA, M.C.; ANDRADE, U.V.C. Contagem de células somáticas e escore de células somáticas em amostras de leite de tanques. In: 2º CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DA MASTITE, Ribeirão Preto: 2002. **Anais eletrônico...** [CD-ROM], Ribeirão Preto, 2002.
- RISTOW, L.E.; PEREZ JÚNIOR, A.A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico da mastite. **Leite Integral**, Ano 3. Caderno Especial 4 – Mastite, março, 2008.
- RODRIGUES, A.E.; MARQUES, J.R.F.; ARAÚJO, C.V. et al. Estimação de parâmetros genéticos para características produtivas em búfalos na Amazônia Oriental. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 712-717, 2010.
- ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos da Imunologia**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004. 489p.
- ROSA, B.R.T.; FERREIRA, M.M.G.; AVANTE, M.L. et al. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. **Publicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/FAMED**, n. 8, 2007.
- ROSHANFEKR, H.; MAMOUEI, M.; BOJARPOUR, M. Quarter differences in milk yield, composition, milking behavior in khuzestan buffaloes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 8, p. 1208-1211, 2010.
- ROSSI, F. S.; CECCON, M. E. J. R.; KREBS, V. L. J. Infecções estafilocócicas adquiridas nas unidades de terapia intensiva neonatais. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2005.
- SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 320-326, 2004.
- SAHOO, G.; MORE, T.; SINGH, V.K. A comparative study on certain enzymes of the granulocyte from different ruminant species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 319-325, 2006.
- SAKEMI, Y.; TAMURA, Y.; HAGIWARA, K. Interleukin-6 in quarter Milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Research**, n. 78, p. 118-121, 2011.
- SAMPAIO NETO, J.C.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, N.B.; TONHATI, H. Avaliação do desempenho produtivo e reprodutivo de um rebanho bubalino no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 368-373, 2001.

SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: 2º CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, Ribeirão Preto, 2002. **Anais...** Ribeirão Preto: [s.n.], p. 179-188, 2002.

SARIKAYA, H.; SCHLAMBERGER, G.; MEYER, H.H.D.; BRUCKMAIER, R.M. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2479-2486, 2006.

SCHUKKEN, Y.H.; LESLIE, K.E.; BARNUM, D.A. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. **Journal of Dairy Science**, n. 82, p. 2393-2401, 1999.

SEARS, P.M.; SMITH, B.S.; ENGLISH, P.B. et al. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, n. 73, p. 2785 – 2789, 1990.

SEYKORA, A.J.; McDANIEL, B.T. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: A review. **Journal of Dairy Science**, n. 68, p. 2087-2093, 1985.

SHOSHANI, E.; LEITNER, G.; HANOCHI, B. et al. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 2, p. 155-169, 2000.

SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M. et al. Impact of acute clinical mastitis on cow behavior. **Applied Animal Behavior Science**, n. 132, p. 101-106, 2011.

SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell count in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137, 1994.

SILVEIRA, T.M.L.; FONSECA, L.M.; LAGO, T.B.N.; VEIGA, D.R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.1, p. 128-132, 2005.

SIMOJOKI, H.; SALOMÄKI, T.; TAPONEN, S. et al. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. **Veterinary Research**, v. 42, n. 49, p. 1-10, 2011.

SINGH, J.; NANDA, A.S.; ADAMS, G.P. The reproductive pattern and efficiency of female Buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 593-604, 2000.

SINGH, M.; LUDRI, R.S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, paryti, and season. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, n. 14, p. 189-192, 2001.

SINGH, R.S.; KUMAR, R.; YADAV, B.R. Distribution of pathogenic factors in *Staphylococcus aureus* strains isolated from intramammary infections in cattle and buffaloes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 410-416, 2011.

SIUGZDAITE, J.; ZILINSKAS, H.; LAURINAVICIUTE, V. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* isolated from milk of goats with mastitis. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 29, n. 51, 2005.

SOELL, M.; DIAB, M.; HAAN-ARCHIPOFF, G. et al. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 4, p. 1380-1386, 1995.

SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. **Journal of Dairy Science**, n. 72, p. 228-240, 1989.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

SOUZA, D.D.P. **Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para saúde pública. Estudo dos fatores relacionados a esse consumo na cidade de Jacaréi – SP.** 2005, 114f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SUBEDI, K.; DHAKAL, I.P. Clinical mastitis in different breeds of cattle and buffaloes at Chitwan, Nepal. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, n. 23, p. 65-69, 2002.

TESFAYE, G.Y.; REGASSA, F.G.; KELAY, B. Milk yield and associated losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health Production**, n. 42, p. 925-931, 2010.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals.** 8 ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1988. 951p.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – uma introdução**, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.

TONHATI, H.; CÉRON MUÑOZ, M.F.; OLIVEIRA, J.A. et al. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2051-2056, 2000.

TORRES, A.H.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; DEGRAVES, F.J. Diagnosis of intramammary infections at dry-off based on sampling strategy, epidemiology of pathogens, and agreement beyond chance. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 21, p. 427 – 436, 2009.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRIPALDI, C.; PALOCCI, G.; MIARELLI, M. et al. Effects of mastitis on buffalo milk quality. **Asian-Australasian Journal of Animals Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1319-1324, 2010.

URASHIMA, T.; FUKUDA, K.; MESSER, M. Evolution of milk oligosaccharides and lactose: a hypothesis. **Animal**, v. 6, n. 3, p. 369-374, 2012.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, n. 92, p. 179-185, 2003.

VAZ, A.K. Imunidade da glândula mamária. **Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite em Revista**, v.1, n. 5, p. 16-19, 2004.

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C. Características do leite. **Boletim Técnico – PIE-UFES 01007**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2007.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E.; SENYK, G.F. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, n. 70, p. 230-242, 1987.

VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A. Eficiência do California Mastitis Test (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 3-4, 1990.

WALKER, J.B.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; DEGRAVES, F.J. The effect of inoculum volume on the microbiologic detection of naturally occurring *Staphylococcus aureus* intramammary infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 22, p. 720–724, 2010.

WALKER, J.B.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; WALKER, W.L. et al. Variation in daily shedding patterns of *Staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1114–1122, 2011.

WATSON, C.J.; OLIVER, C.H.; KHALED, W.T. Cytokine signaling in mammary gland development. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, p. 124-129, 2011.

WEDHOLM, A.; MOLLER, H.S.; LINDMARK-MANSSON, H. et al. Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cell counts using LC MALDI MS/MS detection. **Journal of Dairy Research**, n. 75, p. 76-83, 2008.

WENS, J.R.; FOX, L.K.; MULLER, F.J. et al. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2458-2470, 2010.

WERNER, S.; COLIN, D.A.; CORAIOLA, M. et al. Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. **Infection and Immunity**, n. 70, p. 1310-1318, 2002.

WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 23 maio 2008.

- WICKSTROM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MANSSON, H. et al. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, n. 76, p. 195-201, 2009.
- WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W. et al. **KONEMAN'S - Diagnóstico Microbiológico**, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.
- YADAV, B.R.; KUMAR, R. Incidence of Staphylococci and Streptococci during winter in mastitic milk of Sahiwal cow and Murrah buffaloes. **Indian Journal Microbiology**, Article in Press, 2011.
- YANG, F.L.; LI-SHAN, X.; ELE, B.X. et al. Bovine mastitis in subtropical dairy farms, 2005 – 2009. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 1, p. 68-72, 2011.
- ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. et al. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, n. 40, p. 177-183, 2006.
- ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis : causes and control. **Journal of Animal Science**, n. 86, p. 57-65, 2008.
- ZICARELLI, L. Buffalo Milk: Its properties, dairy yield and mozzarella production. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 127–135, 2004.
- ZOCCAL, R.; STOCK, L.A. Estrutura da produção de leite no Brasil. In: STOCK, L.A. et al. **Competitividade do Agronegócio do Leite Brasileiro**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2011. 326p.

CAPITULO 2

**EFEITO DA MASTITE INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus* (SBP 09/10) NA
PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE BUBALINO E BOVINO**

1 RESUMO

S. aureus é um importante patógeno contagioso da mastite e responsável por vultosas perdas nos rebanhos leiteiros. O objetivo deste experimento foi investigar a reação inflamatória e alterações na produção e composição do leite bubalino e bovino a partir da exposição da glândula mamária ao mesmo patógeno (*S. aureus* - SBP 09/10) e verificar a viabilidade deste modelo experimental, já utilizado em vacas, na indução de mastite em búfalas. A inoculação intramamária de *S. aureus* em búfalas (Murrah) e em vacas (Holandês x Zebu) resultou na indução de processo inflamatório, com migração mais rápida de células de defesa para a glândula mamária das búfalas, em contagem máxima de células somáticas (CS) semelhante ($p > 0,05$) entre as duas espécies e redução da contagem à níveis fisiológicos no leite da ordenha completa das búfalas, ao final do experimento. Durante o período de observação, pós-inoculação, houve uma redução de produção de leite de 37,33% nas búfalas e 47,17% nas vacas e foi detectada alteração ($p < 0,05$) nos teores de lactose e extrato seco desengordurado (ESD). Estes dois parâmetros apresentaram correlação negativa ($p < 0,05$) com a contagem de células somáticas (CCS). Os demais parâmetros analisados, gordura, proteína total e extrato seco total (EST) não sofreram influência pós-inoculação da bactéria.

Palavras-chave: bovino, bubalino, indução de mastite e produção e composição do leite.

2 ABSTRACT

S. aureus is an important contagious pathogen of mastitis and responsible for heavy losses in dairy herds. The objective of this experiment was to investigate the inflammatory response and alterations in the production and composition of bubaline and bovine milk from exposure of mammary gland to the same pathogen (*S. aureus* - SBP 09/10) and to verify the feasibility of this experimental model, already used in cows, to the induction of mastitis in buffaloes. The intramammary inoculation of *S. aureus* in buffaloes (Murrah) and cows (Holstein x Zebu) resulted in induction of inflammatory process, with faster migration of immune cells into the mammary gland of buffaloes, maximum somatic cell count (SC) similar ($p > 0.05$) to both species and count reduction to physiological levels in buffalo complete milking at the end of the experiment. During the observation period, post inoculation, there was a reduction in milk production of 37.33% in buffaloes and 47.17% in cows, also it was detected alteration ($p < 0.05$) in levels of lactose and dry nonfat solids (DNS). These two parameters were negatively correlated ($p < 0.05$) with somatic cell count (SCC). The other analyzed parameters, fat, total protein and total dry solids (TDS) were not influenced by bacteria post inoculation.

Keywords: bovine, bubaline, mastitis induction, milk production and composition.

3 INTRODUÇÃO

A mastite é um importante problema sanitário encontrado em bubalinos e bovinos. Provoca alteração na quantidade e qualidade do leite, levando a uma baixa estabilidade de seus componentes e baixo rendimento industrial (Wickstrom et al., 2009). Entre os agentes etiológicos, destaca-se o *S. aureus*, citado como o mais prevalente (Oliveira et al., 2011).

A patogenia da enfermidade explica as principais alterações detectadas, como alta contagem de células somáticas (CCS), diminuição de produção e modificação na concentração de alguns componentes do leite (Tripaldi et al., 2010). A CCS pode ser influenciada por vários fatores, porém, sua elevação é uma resposta modulada por mediadores da inflamação, sendo que o principal fator envolvido é o *status* de infecção (Amaral et al., 2005).

O leite é um produto complexo e nutritivo. Industrialmente, os componentes mais valorizados são a caseína, lactose e a matéria gorda. A produção e a composição do leite são variáveis de acordo com alimentação, idade, estágio de lactação, raça e condição sanitária da glândula mamária. Na mastite por *S. aureus*, a diminuição da função secretória da glândula ocorre pois o patógeno ao se aderir e multiplicar, produz substâncias citotóxicas que danificam o tecido mamário secretor (Akers & Nickerson, 2011). Ainda, enzimas oriundas de leucócitos provocam danos em células epiteliais da glândula e ação direta sobre determinados componentes do leite (Kitchen et al., 1984).

A associação entre CCS, produtividade e qualidade do leite e de seus derivados lácteos (Hand et al., 2012) fez com que determinados países estipulassem a contagem máxima aceitável de CS/mL em leite cru refrigerado. A União Européia (27 países), estipulou um

limite de 400.000 CS/mL de leite bovino (EC, 2004) enquanto no Brasil, a IN nº 62/2011 estipula uma contagem máxima de 600.000 CS/mL em leite cru refrigerado bovino, devendo, a partir de 2014, reduzir esta contagem para 500.000 CS/mL e em 2016, 400.000 CS/mL, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MAPA, 2011).

O interesse pela criação da espécie bubalina aumentou nos últimos anos (FAO, 2010), motivado por vários fatores, entre eles, produção de proteína de alta qualidade, representada pelo leite e carne. A necessidade para que leite de boa qualidade chegue ao consumidor e à indústria de laticínios, exige um conhecimento efetivo sobre a importância e os efeitos da mastite nesta espécie.

O objetivo desse trabalho, foi avaliar alterações na composição e produção do leite de bubalinos e bovinos e a sua correlação com a contagem de células somáticas (CCS) antes e após indução da mastite por inoculação intramamária de *S. aureus*, bem como verificar a viabilidade do modelo experimental de indução de mastite em búfalas, já que este estudo é o primeiro a apresentar este modelo experimental. As informações obtidas deverão ser úteis para o entendimento do efeito da mastite sobre a glândula mamária bubalina e para reconhecer semelhanças e diferenças do processo inflamatório nas duas espécies animais a partir da exposição ao mesmo patógeno, sob as mesmas condições de manejo e ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 fêmeas primíparas, com um a dois meses de lactação, sendo 12 da espécie bubalina (raça Murrah) e 08 da espécie bovina (mestiças Holandês x Zebu), ordenhadas uma vez ao dia com bezerro ao pé. Os animais foram adaptados tanto à ordenha mecânica como manual e estavam livres de alterações clínicas e infecções nas glândulas mamárias, confirmado por três culturas diárias consecutivas negativas do leite, caneca telada e reação ao *California Mastitis Test* (CMT) negativos. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética das Faculdades Integradas da União Pioneira de Integração Social (UPIS) (Protocolo nº 005/10).

O isolado bacteriano utilizado foi o SBP 09/10, amostra de campo obtida de vacas com mastite e a preparação do inóculo foi efetuada segundo a descrição de alguns pesquisadores, com modificações (Bannerman et al., 2004; Almeida et al., 2005; Martins Filho, 2006). A bactéria liofilizada foi inoculada em *Brain Heart Infusion* e incubada a 37°C por 15h. Posteriormente, 1 mL deste inóculo foi adicionado à 9 mL de água peptonada 0,1% (10^{-1}), e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Alíquotas (10 µL) de cada diluição foram semeadas, pelo método em superfície, em ágar sangue (AS) ovino 5%, em duplicata, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (Martins Filho, 2006). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Uma alíquota de 100 µL da diluição 10^{-4} foi adicionada à 5 mL de salina esterilizada 0,85%, alcançando, nesse volume total, aproximadamente 1000 UFC do *S. aureus*. A glândula anterior esquerda (AE) de todos os animais foi inoculada com 5 mL de salina contendo 1000 UFC e a contralateral (AD) com 5 mL de salina esterilizada 0,85% (controle). Alíquotas do inóculo aplicado foram encaminhadas ao laboratório para avaliar pureza, viabilidade e UFC/mL.

O experimento foi realizado em duas etapas, pré (Dia 1 a D3) e pós-inoculação (D4 a D14). No D3, imediatamente após a ordenha completa de cada animal, foram realizadas as inoculações. Os inóculos foram aplicados no canal da teta previamente higienizada, utilizando-se uma cânula acoplada a uma seringa. Nos dias D1 e D2 (pré-inoculação) e D4, D6, D8, D10, D12 e D14 (pós-inoculação), foram avaliadas a produção, composição do leite e a CCS por glândula e por animal (leite da ordenha completa do animal). Para isto, as glândulas AE e anterior direita (AD) foram ordenhadas em recipientes individuais e as glândulas posteriores esquerda (PE) e direita (PD) foram ordenhadas em recipiente comum. O conteúdo de cada recipiente foi pesado, o leite foi homogeneizado, coletado e acondicionado em frasco com o conservante Bronopol® (amostra da glândula). Em seguida, o conteúdo dos 3 recipientes de cada animal foi reunido e passou pelo mesmo procedimento (leite da ordenha completa do animal). As amostras foram enviadas ao laboratório sob refrigeração e a CCS foi realizada eletronicamente (CECS), pelo método de citometria de fluxo utilizando o equipamento Fossomatic 5000 Basic® (FOSS Eletric A/S. HILLEROD, Denmark) e a análise de composição do leite (proteína, lactose, gordura, ESD e EST) pelo método eletrônico utilizando o equipamento Milkoscan 4000® (FOSS Eletric A/S. HILLEROD, Denmark). Os aparelhos foram calibrados com leite bovino.

Durante o período experimental, a cultura do leite foi realizada diariamente. As amostras, obtidas de forma asséptica, foram coletadas de todas as glândulas, após o descarte dos primeiros jatos de leite em caneca telada e limpeza do esfíncter da teta com algodão embebido em álcool 70%. A cultura foi realizada, inoculando-se 30 µL de leite em placas de AS ovino 5%, que foram incubadas a 37°C por 48h.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software STATISTICA* versão 8 (StatSoft, 2007). Foi realizada uma Análise de Variância Fatorial 2 x 2 (2 espécies x 2 períodos) para analisar as diferenças entre as espécies antes e depois da inoculação para os diferentes parâmetros quantitativos avaliados. As médias foram comparadas pelo Teste de Tuckey. As análises de frequência foram efetuadas através do Teste do Qui-Quadrado. Para determinar o grau de associação entre as variáveis de interesse foi realizada Análise de Correlação de Pearson.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

S. aureus foi isolado do quarto mamário AE de todos animais nos três dias consecutivos pós-inoculação e posteriormente, em percentuais variados ao longo do período experimental, demonstrando que o número de UFC utilizado foi capaz de provocar infecção nas duas espécies. Houve necessidade de instituir um tratamento antimicrobiano intramamário em todas as glândulas inoculadas para evitar exacerbação das manifestações clínicas. O tratamento foi realizado com 250 mg de gentamicina (Gentocin® - Coopers, Clivapac, Presidente Prudente, SP, Brasil), que *in vitro* demonstrou ação satisfatória, infundida por três dias consecutivos (D6, D7 e D8) pós-ordenha completa das glândulas. Os quartos mamários infundidos com salina esterilizada 0,85% e os quartos PE e PD permaneceram livres de infecção ao longo do período experimental.

Nos dias que antecederam a inoculação, a mediana da CCS da glândula AE encontrava-se dentro dos parâmetros considerados fisiológicos, 18.000 nas vacas e 26.000 nas búfalas. Foi observado aumento ($p < 0,05$) na CCS pós-inoculação de *S. aureus*, nas duas espécies (Figura 1). Nas 24h pós-inoculação (D4), a contagem nas búfalas, foi significativamente maior que a contagem nas vacas ($p < 0,001$), sendo que a mediana do pico de CS foi semelhante nas duas espécies (7.522.000 CS/mL nas búfalas e 7.495.000 CS/mL nas vacas), porém em momentos distintos, mais cedo nas búfalas (D4) e mais tardio nas vacas (D6). Ao final do experimento (D14), as búfalas apresentavam uma mediana de 326.000 CS/mL e as vacas de 3.952.000 CS/mL de leite da glândula AE. O aumento na CCS ocorre pela resposta inflamatória local induzida pelo patógeno, que provoca alteração na permeabilidade vascular, estimula as células endoteliais a expressarem adesinas aos neutrófilos e induz migração transepitelial principalmente desse leucócito, que é a célula infiltrada em maior quantidade no tecido mamário infectado (Tripaldi et al., 2010).

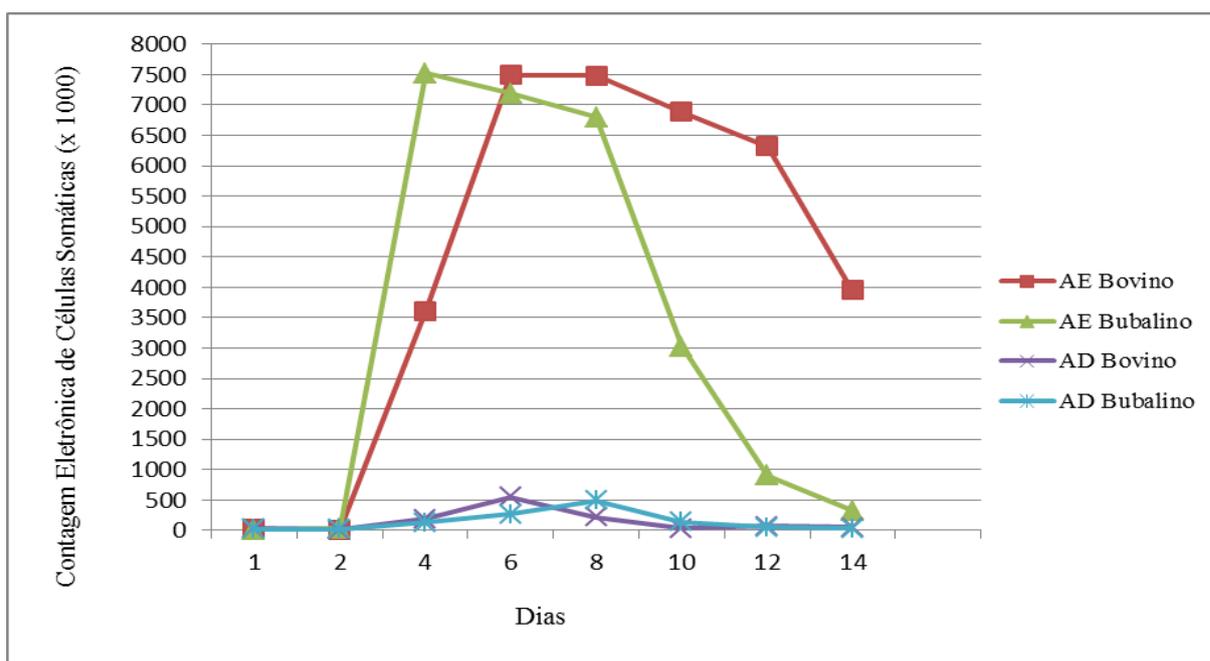


Figura 1 - Efeito da inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE e de 5 mL de salina esterilizada 0,85% na teta AD de vacas e búfalas sobre a CECS (mediana) nos diferentes dias do experimento.

Neste trabalho foi utilizada a mediana na avaliação da CCS pois os desvios padrões foram muito elevados, demonstrando uma grande variação na resposta individual. Isto dificultou comparações com alguns trabalhos de indução que utilizaram médias de CCS. Almeida et al. (2005) induziram mastite utilizando 10 mL de uma suspensão contendo 1000 UFC/mL de *S. aureus* em vacas mestiças. Os autores detectaram uma mediana de 488.710 CS/mL entre o 3º e 9º dias pós-inoculação, não relatando valores individualizados por dia. Bannerman et al. (2004) detectaram aumento na CCS em vacas da raça Holandesa às 16h pós-inoculação, registrando a média do pico às 40h (30.000.000 CS/mL), utilizando um inóculo com 74 UFC. Martins Filho et al. (2007) realizaram indução com 500 UFC em 5 mL de água destilada esterilizada e detectaram uma média de 2.432.660 CS/mL de leite em um único momento analisado pós-inoculação (72h).

Não existem relatos de indução de mastite em búfalas para se traçar uma comparação, porém, observou-se uma mediana de número máximo de CS praticamente idêntica nas duas espécies inoculadas, mas, em momentos distintos. Pôde-se observar que as búfalas apresentaram uma resposta inflamatória localizada mais rápida e menos duradoura, sugerindo que esta espécie apresenta maior capacidade que as vacas para alcançar estado sanitário satisfatório da glândula mamária, uma vez que a CCS é o parâmetro rotineiramente utilizado para esta avaliação.

Os quartos mamários inoculados com 5 mL de salina esterilizada apresentaram uma leve resposta inflamatória (Figura 1). Bannerman et al. (2004) não detectaram essa indução em bovinos, provavelmente pelo menor volume inoculado (2 mL de PBS), já Martins Filho et al. (2007) relataram elevação na CCS nas glândulas controle, inoculadas com 5 mL de água destilada esterilizada.

A evolução da CCS no leite da ordenha completa dos animais pode ser observada na Figura 2. As medianas dos picos ocorreram nos mesmos momentos das glândulas inoculadas com *S. aureus*, D4 nas búfalas e D6 nas vacas (Figura 1). Nas búfalas, o pico alcançou 4.313.000 CS/mL e nas vacas, 6.509.000 CS/mL. Ao se comparar o valor das medianas dos picos nas glândulas inoculadas com *S. aureus* (Figura 1) e do leite da ordenha completa dos animais (Figura 2), percebe-se que no primeiro caso os picos foram bastante próximos e no leite da ordenha completa, muito distantes. Isto poderia ser justificado pelo número mais elevado de CS na glândula AD, PD e PE das vacas, ao longo do período experimental. Como exemplo pode-se citar a situação do D14, onde a mediana da glândula AD das vacas foi de 51.000 CS/mL e das búfalas, 35.000 CS/mL e a mediana das glândulas PD e PE das vacas foi de 158.000 CS/mL enquanto nas búfalas foi de 37.000 CS/mL. Outro fator que poderia ter contribuído seria o volume do leite da glândula AE, em percentuais, em relação ao volume total de leite do animal. A glândula AE das búfalas contribuiu, em média, com 14,10% do leite da ordenha completa do animal, enquanto que a AE das vacas contribuiu, em média, com 29,12%. Isto significa maior diluição das células somáticas do leite bubalino.

A mediana da CCS no leite da ordenha completa, nos bubalinos, era no D14, de 58.000 CS/mL, e nos bovinos, de 423.000 CS/mL. Esses números indicam que as búfalas alcançaram valores considerados fisiológicos, pois segundo o National Mastitis Council (1996) citado por Arcuri et al. (2004), no leite de vacas livres de infecção intramamária encontra-se até 200.000 CS/mL e Tripaldi et al. (2010), afirmaram que este mesmo valor pode ser utilizado como o limiar entre uma glândula mamária saudável e uma com mastite subclínica em búfalas. Dhakal et al. (2008), revelaram contagens médias de 171.000 em glândulas saudáveis, 799.000 em mastite subclínica e 6.039.000 em mastite clínica de búfalas e Medeiros et al. (2011), consideraram uma glândula mamária bubalina hígida aquela com até 400.000 CS/mL de leite.

Ao final do experimento, a mediana do leite da ordenha completa das vacas encontrava-se dentro do parâmetro de CCS aceito pela legislação brasileira, para leite cru refrigerado (MAPA, 2011) e fora dos limites estipulados pela União Européia (EC, 2004).

Entretanto, para o leite bubalino, se fossem utilizadas as regulamentações existentes para leite bovino, os valores estariam dentro dos limites aceitáveis no Brasil e na Europa.

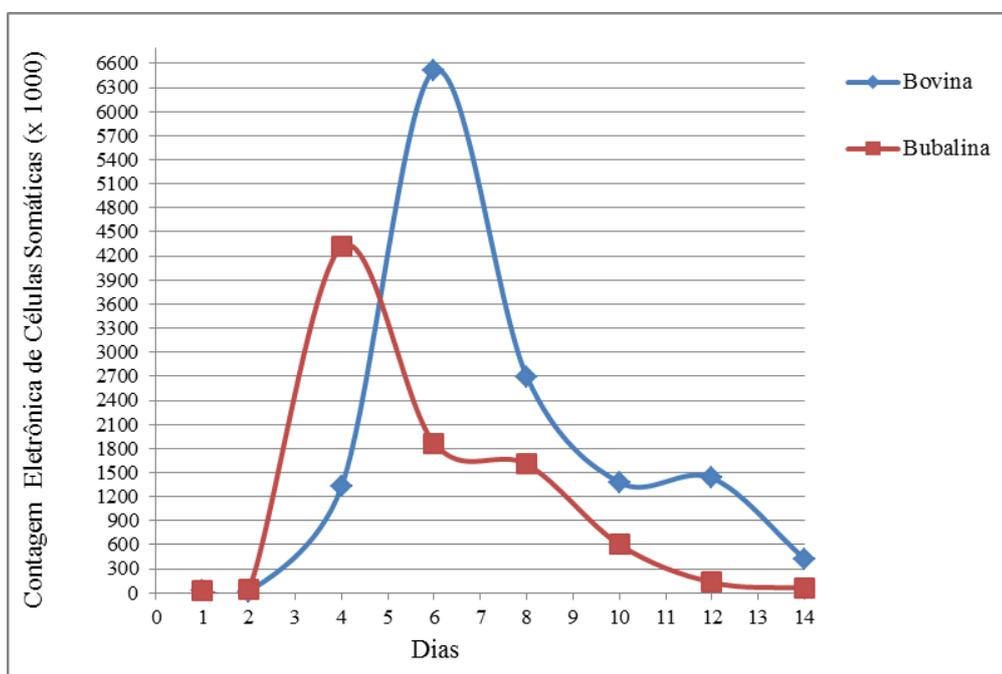


Figura 2 - Efeito da inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S.aureus* na teta AE e de 5 mL de salina esterilizada 0,85% na teta AD de fêmeas bovinas e bubalinas, sobre a CECS (mediana) no leite da ordenha completa do animal, nos diferentes dias do experimento.

A produção média diária de leite, anterior a inoculação, das vacas e búfalas era de 3,64 e 5,32 kg/leite/dia, respectivamente (Tabela 1). As vacas apresentaram uma produção semelhante à maioria dos bovinos ordenhados no Brasil, ou seja, menos de 4 kg/dia (Zoccal & Stock, 2011) e as búfalas apresentaram produção similar às observadas em levantamentos realizados no Brasil e no mundo (Jorge et al., 2005; Khan et al., 2011).

As duas espécies apresentaram uma queda significativa na produção de leite da glândula AE ($p < 0,05$) após a inoculação (Tabela 1). Pré-experimento, e antes da inoculação bacteriana, a ordenha foi realizada com bezerro ao pé, no intuito de estimular a descida do leite por meio da mamada. Após a indução da mastite, os bezerros estavam presentes, porém, a estimulação foi conduzida. Isso interferiu na descida do leite e foi necessário, a partir do D4, aplicar 20 UI/animal de ocitocina antes de cada ordenha (Ocitocina Forte® - UCB – Uzinhas Químicas Brasileiras SA, Jaboticabal, SP, Brasil). É possível observar na Tabela 1 que não houve diferença ($p > 0,05$) no peso do leite da ordenha completa do animal, antes e pós-inoculação da bactéria. Isto poderia ser justificado pela aplicação do hormônio e pela produção compensatória de leite nas demais glândulas (Park, 2005). Entretanto, mesmo com a

aplicação de ocitocina, a produção de leite da glândula AE das duas espécies foi menor após a inoculação. A redução foi de 47,17% nos bovinos e de 37,33% nos bubalinos.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da produção e composição do leite pré e pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) em bubalinos e bovinos

Parâmetros	Bubalinos		Bovinos		P
	Pré-inoculação	Pós-inoculação	Pré-inoculação	Pós-inoculação	
Produção de Leite - AE (kg/dia)	0,75 ^a (0,22)	0,47 ^b (0,32)	1,06 ^c (0,45)	0,56 ^a (0,54)	0,002
Produção de Leite – ordenha completa (kg/dia)	5,32 ^a (1,22)	5,04 ^a (1,74)	3,64 ^b (1,63)	3,86 ^b (1,18)	0,019
Gordura - AE (%)	4,94 ^a (1,11)	4,15 ^a (1,27)	2,50 ^b (0,97)	3,02 ^b (1,73)	0,001
Gordura – Leite da ordenha completa (%)	5,35 ^a (0,72)	5,51 ^a (2,06)	2,36 ^b (1,07)	3,50 ^b (1,53)	0,0001
Proteína Total - AE (%)	3,49 ^a (0,35)	3,95 ^a (1,08)	2,98 ^a (0,32)	3,46 ^a (0,47)	> 0,05
Proteína Total - Leite da ordenha completa (%)	3,45 ^a (0,39)	3,64 ^a (0,45)	3,00 ^a (0,31)	3,12 ^a (1,51)	> 0,05
Lactose - AE (%)	5,19 ^a (0,15)	3,75 ^b (1,20)	4,91 ^a (0,13)	3,12 ^b (1,51)	0,0001
Lactose – Leite da ordenha completa (%)	5,22 ^a (0,13)	5,02 ^a (0,17)	4,90 ^a (0,14)	4,41 ^b (0,40)	0,0048
ESD - AE (%)	9,66 ^a (0,41)	8,77 ^b (0,79)	8,86 ^b (0,37)	7,65 ^c (1,37)	0,0001
ESD – Leite da ordenha completa (%)	9,63 ^a (0,47)	9,62 ^a (0,46)	8,86 ^b (0,35)	8,55 ^b (0,35)	0,0001
EST - AE (%)	14,59 ^a (1,31)	12,92 ^a (1,67)	11,36 ^b (1,11)	10,68 ^b (1,67)	0,003
EST - Leite da ordenha completa (%)	14,99 ^a (1,02)	14,16 ^a (0,86)	11,23 ^b (1,20)	12,05 ^b (0,60)	0,0001

* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p>0,05).

Em trabalhos de indução de mastite com *S. aureus*, em bovinos leiteiros da raça Holandesa, tem sido observada redução de 21 a 50% na produção total de leite. Bannerman et al. (2004) encontraram uma redução de 21,10% em vacas com produção inicial de 25-30 L leite/dia e Petzl et al. (2008), em vacas que produziam entre 15-25 L leite/dia,

queda de produção de 50% nas primeiras 12h e nas três semanas seguintes estabilização da produção em 70% do peso do leite pré-inoculação.

O teor de gordura do leite foi similar pré e pós-inoculação. Foi verificado um maior teor de gordura no leite das búfalas ($p < 0,05$), tanto no leite da glândula AE quanto no leite da ordenha completa. Sabe-se que a quantidade de gordura no leite é variável de acordo com alimentação, sanidade, idade, estágio de lactação, espécie e raça do animal. Vários autores relataram queda na concentração de gordura no leite mastítico bovino, provocado por danos no tecido secretor e pela lipólise induzida por enzimas provenientes de neutrófilos (Gargouri et al., 2008). A avaliação dos teores de gordura e produção de leite nos diferentes dias mostrou que houve um pico nos teores de gordura (D6) no mesmo dia em que houve uma redução brusca de produção de leite, tanto em vacas como búfalas. Essa situação encontrada pode ser explicada por Schultz (1977) citado por Bansal et al. (2005) que sugeriu um aparente aumento no teor de gordura em situações de forte redução na produção de leite e Bansal et al. (2005) não consideraram os teores de gordura como bons indicadores da mastite o que foi reafirmado por Cerón-Muñoz et al. (2002) que encontraram, em leite bubalino, aumento no percentual de gordura conforme elevação na CCS.

O teor de proteína total no leite da glândula AE e no leite da ordenha completa foi semelhante entre as duas espécies ($p > 0,05$) e entre os dois períodos ($p > 0,05$) e, encontrava-se, antes da inoculação, próximo dos valores mínimos descritos (Medhammar et al., 2011) (Tabela 1). Segundo Wickstrom et al. (2009), o processo inflamatório na glândula mamária acarreta diminuição na proteína total, diminuição da caseína e aumento das proteínas do soro sanguíneo. Le Maréchal et al. (2011), em ampla revisão sobre o impacto da mastite sobre a qualidade do leite de vacas, cabras e ovelhas, concluíram que a concordância entre os pesquisadores ocorre em relação à diminuição da caseína e ao aumento das proteínas do soro, não sendo unânime em relação à proteína total. Bastos & Birgel (2011) demonstraram que os teores de proteína se mantiveram constantes e independentes do escore do CMT detectado em leite bubalino. Mungatana et al. (2011) não encontraram diferença pré e pós-inoculação de *S. aureus* em cabras leiteiras. Os autores justificaram que provavelmente o aumento exagerado das proteínas do soro mascararam a queda no teor da caseína.

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as espécies no teor de lactose, no período pré-inoculação, tanto na glândula AE como no leite da ordenha completa. No período pós-inoculação, nas duas espécies, houve uma queda na concentração de lactose no leite da glândula AE ($p < 0,05$). No leite da ordenha completa só houve redução ($p < 0,05$) da concentração de lactose na espécie bovina, enquanto as bubalinas apresentaram valores

semelhantes ($p > 0,05$). Só foram observadas diferenças na lactose entre as duas espécies, no leite da ordenha completa, no período pós-inoculação, onde as bovinas apresentaram teores menores do que as bubalinas ($p < 0,05$).

Segundo Le Maréchal et al. (2011) há um consenso entre os pesquisadores sobre a queda nos teores de lactose em vacas e ovelhas com mastite. Fonseca & Santos (2000) relataram decréscimo de cerca de 10% em vacas com mastite subclínica e Mungatana et al. (2011) redução de 8% em cabras com mastite induzida por *S. aureus*. Em búfalas, Cerón-Munõz et al. (2002a) detectaram queda significativa nos teores de lactose em leite com alta CCS. A redução nos teores de lactose da glândula AE das vacas foi de 36,46% e nas búfalas de 27,75%, percentual superior ao registrado por Bastos & Birgel (2011) que detectaram uma redução de 20,76% em búfalas apresentando um escore 2+ no CMT. No leite da ordenha completa, as vacas apresentaram uma queda de 10% e as búfalas de 3,83%. A queda da lactose ocorre pela reduzida atividade sintética do tecido mamário danificado e Fonseca & Santos (2000) relacionam com a redução na produção de leite, visto que a lactose controla o volume de leite dentro do lúmen alveolar, sendo que cada micrograma desse constituinte arrasta cerca de 10 vezes o volume em água. Neste experimento, o dia com os menores teores de lactose (D6) coincidiu com o dia de menor produção.

O leite é composto pela parte úmida, a água, e pela parte sólida, representada por dois grupos de componentes, o EST e o ESD. A Tabela 1 mostra que foi observada diferença, entre as espécies, no EST do leite obtido da glândula AE e no leite da ordenha completa do animal, sendo que as búfalas mostraram concentrações superiores ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os períodos para as duas espécies ($p > 0,05$). Resultado semelhante foi encontrado ao analisar o ESD no leite da ordenha completa, porém, foi observada diferença significativa, entre as espécies e entre os períodos, no leite obtido da glândula inoculada com a bactéria ($p < 0,05$). A glândula AE das vacas apresentou redução nos teores de ESD de 13,66 % e nas búfalas, a redução foi de 9,21%. O constituinte que possivelmente definiu este perfil foi a lactose, único que estatisticamente apresentou queda pós-inoculação de *S. aureus*.

Foram observadas correlações negativas entre CCS do leite bovino e teores de lactose ($r = -0,88$; $p < 0,05$) e ESD da glândula AE ($r = -0,62$; $p < 0,05$). Este resultado também se verificou nas búfalas, com correlação entre CCS e teor de lactose de $-0,64$ ($p < 0,05$) e entre CCS e teor de ESD de $-0,57$ ($p < 0,05$). Os demais parâmetros do leite não apresentaram correlação com a CCS. Resultado semelhante foi relatado por Bastos & Birgel (2011), ao realizarem um estudo observacional no intuito de correlacionar escores de CMT e

constituintes físico-químicos do leite bubalino e por Jorge et al. (2005) e Barreto et al. (2010) que não encontraram correlação entre CCS e teores de gordura e proteína.

6 CONCLUSÕES

A inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) é capaz de provocar reação inflamatória em bubalinos e bovinos. Há diferença na fisiopatologia da mastite entre as duas espécies, tendo em vista que a migração das células de defesa é mais rápida na bubalina e a persistência maior na bovina. Em consequência, o retorno aos parâmetros fisiológicos de CCS na espécie bubalina torna-se mais precoce. O processo inflamatório induzido provoca redução na produção de leite e nos teores de lactose e de ESD em bubalinos e bovinos. Há correlação negativa entre a CCS e os teores de lactose e ESD.

7 AGRADECIMENTOS

À UPIS, por disponibilizar as búfalas, local e instalações para o desenvolvimento do experimento; ao Laboratório de Bacteriologia do Depto de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo isolamento e doação da bactéria inoculada e ao Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela realização da CCS e avaliação da composição do leite.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERS, R.M.; NICKERSON, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 275-289, 2011.
- ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1-6, 2005.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, J.R.F. et al. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1497-1500, 2004.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.
- BANSAL, B.K.; HAMANN, J.; GRABOWSKIT, N.T.; SINGH, K.B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 144-152, 2005.
- BARRETO, M.L.J.; RANGEL, A.H.N.; ARAÚJO, V.M. et al. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 6, n. 2, p. 47-52, 2010.
- BASTOS, P.A.S.; BIRGEL, E.H. Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV – SP**, v. 9, n. 3, p. 06-13, 2011.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 324, p. 8-10, 2002.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. et al. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2885-2889, 2002a.

DHAKAL, I. P.; NEUPANE, M.; NAGAHATA, H. Evaluation of direct and indirect measures of quarter milk from crossbred buffaloes. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 5, p. 628-633, 2008.

EC. Corrigendum to regulation nº 853/2004 of the European Parliament and of the council of 29 april 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin: **Official Journal of the European Union**, [2004]. Disponível em: <<http://eur-ex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:EN:PDF>>. Acesso em: 27 mar. 2012.

FAO. (**Food and Agriculture Organization**), [2010]. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

GARGOURI, A.; HAMED, H.; EL FEKI, A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with lipolysis. **Livestok Science**, v. 113, p. 274-279, 2008.

HAND, K.J.; GODKIN, A.; KELTON, D.F. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1358 – 1362, 2012.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B. et al. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KHAN, S.; QURESHI, M.S.; AHMED, I.; SHAH, S.M. Milk composition and yield changes with advancing pregnancy in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, n. 35, n. 6, p. 375-380, 2011.

KITCHEN, B.J.; MIDDLETON, G.; KWEE, W.S.; ANDREWS, R.J. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAGase) levels in bulk herd milk. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 227-232, 1984.

LE MARÉCHAL, C.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LE LOIR, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 247 – 282, 2011.

MAPA. (**Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**), [2011]. Disponível em: <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/1824_GED.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2012.

MARTINS FILHO, L.P. **Inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923) em vacas leiteiras: estudo clínico, laboratorial e terapêutico.** 2006, 74f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MARTINS FILHO, L.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CESCO, F.T.R.S. et al. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **ARS Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2007.

MEDEIROS, E.S.; DE FREITAS, M.F.L.; SAUKAS, T.N. et al. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 499-504, 2011.

MEDHAMMAR, E.; WIJESINHA-BETTONI, R.; STADLMAYR, B. et al. Composition of Milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 445-474, 2011.

MUNGATANA, N.K.; NGURE, R.M.; SHITANDI, A. et al. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 360-364, 2011.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

PARK, C.S. Role of compensatory mammary growth in the epigenetic control of gene expression. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, p. 1586 – 1591, 2005.

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J. et al. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, v. 39, n. 2, p. 1-23, 2008.

STATSOFT, INC. **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0, 2007. www.statsoft.com.

TRIPALDI, C.; PALOCCI, G.; MIARELLI, M. et al. Effects of mastitis on buffalo milk quality. **Asian-Australasian Journal of Animals Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1319-1324, 2010.

WICKSTROM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MANSSON, H. et al. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p. 195-201, 2009.

ZOCCAL, R.; STOCK, L.A. Estrutura da produção de leite no Brasil. In: STOCK, L.A. et al. **Competitividade do Agronegócio do Leite Brasileiro**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2011. 326p.

CAPITULO 3

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS PÓS-INDUÇÃO DE MASTITE POR INOCULAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE *Staphylococcus aureus* (SBP 09/10) EM VACAS E BÚFALAS

1 RESUMO

Com este experimento objetivou-se analisar aspectos clínicos e laboratoriais em vacas (Holandês x Zebu) e búfalas (Murrah) submetidas à mastite induzida por inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10), bem como verificar a eficácia de alguns métodos no diagnóstico da mastite bubalina. Os animais tiveram uma glândula inoculada com aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC e foram monitorados por cultura bacteriana do leite, *California Mastitis Test* (CMT) e escores para avaliação da severidade da mastite, baseados na temperatura retal, apetite, produção de leite (resposta sistêmica à inflamação), contagem de células somáticas (CCS), aparência/consistência da glândula e aparência da secreção láctea (resposta localizada à inflamação). Todos animais desenvolveram mastite clínica superaguda. A bactéria foi recuperada de todas as glândulas desafiadas, sem diferença significativa no percentual de isolamento e no Log10 de UFC/mL de leite bovino e bubalino até o 11º dia pós-inoculação, porém diferença ($p < 0,001$) foi detectada no 30º dia pós-inoculação, com recuperação da bactéria em 50% das vacas e 8,33% das búfalas. A reação ao CMT foi detectada nas 24h pós-inoculação, de forma mais intensa nas búfalas, com 75% e 37,5% das reações positivas com intensidade 3+, respectivamente, em búfalas e vacas ($p < 0,05$). Onze dias pós-inoculação, 100% das vacas e 50% das búfalas encontravam-se reagentes ao teste. O CMT demonstrou um resultado semelhante ao detectado pela CCS pelo método eletrônico, com búfalas reagindo mais intensamente logo após a inoculação e diminuição evidente da contagem ao final do experimento. Este resultado semelhante foi confirmado por meio da correlação positiva ($p < 0,001$) entre CMT e Log10 da contagem eletrônica, com um $r=0,90$ para as vacas e $r=0,94$ para as búfalas. Foi detectada correlação, de ambos testes, com a cultura bacteriana ($p < 0,001$). Alterações visuais no leite e na aparência/consistência da glândula foram detectadas, nas duas espécies, nas primeiras 24h. Estes dois parâmetros foram mais intensos e persistentes nas vacas, que adicionalmente apresentaram lesão ulcerativa na

glândula desafiada (25%). Diminuição de produção e alteração no apetite foram evidenciados já nas primeiras 24h. Ao final do experimento observou-se um número maior de bovinos com queda superior a 61% da produção inicial de leite ($p < 0,05$). A elevação da temperatura retal foi verificada nas duas espécies. No D6 (72h pós-inoculação), 100% das vacas e 91,6% das búfalas alcançaram o escore máximo de temperatura ($>39,6^{\circ}\text{C}$). Na avaliação da severidade da mastite, a média do escore total, da resposta local e da resposta sistêmica foram mais elevadas na espécie bovina ($p < 0,05$). Ao longo do período de observação, verificou-se uma capacidade superior das búfalas em recuperar o *status* sanitário adequado, chegando, ao final do experimento, com os parâmetros avaliados mais próximos do fisiológico.

Palavras-chave: indução de mastite, mastite bovina, mastite bubalina, *S. aureus*.

2 ABSTRACT

This experiment aimed to analyze clinical and laboratory aspects in cows (Holstein x Zebu) and buffaloes (Murrah) submitted to mastitis induced by intramammary inoculation of *S. aureus* (SBP 09/10), and to verify the effectiveness of some methods in the diagnosis of bubaline mastitis. The animals had one gland inoculated with approximately $1,0 \times 10^3$ CFU and were monitored by culturing milk, California Mastitis Test (CMT) and scores to assess the severity of mastitis, based on rectal temperature, appetite, milk production (systemic response to inflammation), somatic cell count (SCC), appearance/consistency of the gland and appearance of the milk secretion (localized response to inflammation). All animals developed hyperacute clinical mastitis. The bacteria was recovered from all challenged glands, with no significant difference in the percentage of isolation and Log₁₀ CFU/mL of cow and buffalo milk until day 11 after inoculation. But this difference ($p < 0.001$) was detected at day 30 post inoculation, with bacteria recovery in 50% of cows and 8.33% of buffaloes. The CMT reaction was detected in 24h post inoculation, more intensely in buffaloes, with 75% and 37.5% of positive reactions with 3+ intensity, respectively, in buffaloes and cows ($p < 0.05$). Eleven days after inoculation, 100% of cows and 50% of buffaloes were reagents to this test. The CMT showed a similar result to that detected by SCC by electronic method, with buffaloes reacting more intensely right after inoculation and evident count decrease at the end of the experiment. This similar result was confirmed by the positive correlation ($p < 0.001$) between CMT and Log₁₀ of electronic count, with $r = 0.90$ to cows and $r = 0.94$ to buffaloes. Correlation was detected in both tests with the bacterial culture ($p < 0.001$). Visual alterations in milk and in appearance/consistency of the gland were detected in both species within the first 24h. These two parameters were more intense and persistent in cows, which additionally showed ulcerative lesions in the challenged gland (25%). Decreased production and

alterations in appetite were seen within the first 24h. At the end of the experiment it was observed a higher number of bovines with a drop of more than 61% of the initial milk production ($P<0.05$). The increase in rectal temperature was found in both species. In D6 (72h post inoculation), 100% of cows and 91.6% of buffaloes reached the maximum score of temperature ($>39.6^{\circ}\text{C}$). In assessing the severity of mastitis, the averages of total score, of local response and of systemic response were higher in the bovine species ($p<0.05$). Throughout the observation period, there was a higher capacity of buffaloes in reaching the appropriate sanitary status, coming at the end of the experiment with the parameters closer to the physiological.

Keywords: mastitis induction, bovine mastitis, bubaline mastitis, *S. aureus*.

3 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é considerado o agente etiológico mais prevalente da mastite bovina e bubalina (Kapronezai et al., 2005; Oliveira et al., 2011). É responsável por vultosas perdas em rebanhos leiteiros pelas alterações que provoca no leite e como consequência à indústria (Wickstrom et al., 2009; Le Maréchal et al., 2011), pela interferência na vida reprodutiva (Hernandez et al., 2012) e no bem estar dos animais afetados (Siivonen et al., 2011).

A mastite provocada por esta espécie normalmente é subclínica mas poderá ser clínica dependendo da dose infectante, virulência da cepa e resistência do hospedeiro. Os fatores de virulência da bactéria e a resposta imune do hospedeiro, que poderá variar entre as espécies animais e entre indivíduos, justificam as alterações locais e/ou sistêmicas presentes na mastite (Gravet et al., 1998; Araújo & Gheller, 2005; Gyles et al., 2010; Contreras & Rodrigues, 2011; Le Maréchal et al., 2011a). Elevação na contagem de células somáticas (CCS) (Tripaldi et al., 2010), diminuição de produção (Cassol et al., 2010) e modificações nos níveis de alguns componentes do leite (Bastos & Birgel, 2011) estarão presentes, independente da intensidade da resposta inflamatória.

Esta bactéria é dotada de mecanismos de evasão, fatores que provocam danos ao tecido do hospedeiro, mecanismos de colonização e invasão dos tecidos e indutores/moduladores da resposta inflamatória (Hirsh & Zee, 1999; Reed et al., 2001; Karlsson & Arvidson, 2002; Gyles et al., 2010; Ote et al., 2011). A resposta do hospedeiro aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) e às toxinas superantigênicas são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória, com efeitos locais e sistêmicos, principalmente pela estimulação da produção de citocinas (Roitt & Delves, 2004; Trabulsi & Alterthum, 2005). Esse fenômeno leva, entre outras consequências, à febre, ao aumento da permeabilidade vascular e ao recrutamento de

leucócitos (Carlton & McGavin, 1998; Raulo et al., 2002), importantes na defesa e reparação tecidual (Philpot, 1998) mas que também estão relacionados aos efeitos deletérios sobre o parênquima mamário e sobre os constituintes do leite (Pyörälä, 2003; Napoli et al., 2007; Wedholm et al., 2008). De uma forma geral, o dano ao tecido glandular mamário, ocorre pelos fatores bacterianos e reações imunes do hospedeiro (Zhao & Lacasse, 2008).

O interesse pela criação da espécie bubalina vem aumentando (FAO, 2010) e o conhecimento existente sobre as alterações locais e sistêmicas e evolução da mastite nesta espécie são ainda escassos, bem como são inconclusivas as informações sobre a utilização de parâmetros bovinos para o diagnóstico deste processo inflamatório em bubalinos (Amaral et al., 2005; Carvalho, 2005; Escrivão et al., 2008). Alguns trabalhos relatam a possibilidade de maior resistência da espécie bubalina à mastite e pesquisadores citam particularidades morfológicas, funcionais, químicas e celulares que seriam responsáveis por essa característica (Franciscis & Dipalo, 1994; Silva & Silva, 1994; Araújo & Gheller, 2005). Avaliar o processo inflamatório e seus efeitos na glândula mamária de vacas e búfalas a partir da exposição ao mesmo patógeno, sob condições semelhantes de manejo e ambiente e verificar a eficácia de alguns métodos no diagnóstico da mastite bubalina, constituem objetivos a serem alcançados no presente estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Vinte fêmeas primíparas, com um a dois meses de lactação, 12 da espécie bubalina (raça Murrah) e 08 da espécie bovina (mestiças Holandês x Zebu), foram amostradas e observadas por um período de quatorze dias. Os animais foram ordenhados uma vez ao dia, com bezerro ao pé, e estavam livres de alterações clínicas e infecções nas glândulas mamárias, confirmado por três culturas diárias consecutivas negativas do leite, caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) negativos. O comitê de ética das Faculdades Integradas da União Pioneira de Integração Social (UPIS) aprovou o protocolo desse estudo experimental (Protocolo nº 005/10).

4.2 Organograma do experimento

O experimento foi realizado em duas etapas, pré (D1 a D3) e pós-inoculação (D4 a D14), com as inoculações ocorrendo no D3. As glândulas inoculadas foram a anterior esquerda (AE) e a anterior direita (AD). A AE recebeu o inóculo de *S. aureus* e a AD serviu de controle (salina esterilizada 0,85%). Durante o período experimental foram realizadas as seguintes avaliações: caneca telada, CMT, CCS, cultura bacteriológica do leite, contagem de *S. aureus* no leite e avaliação clínica local e sistêmica. No 30º dia pós-inoculação foi realizado, adicionalmente, coleta de leite para cultura bacteriológica e avaliação clínica local.

4.3 Preparação do inóculo e inoculação intramamária

O isolado bacteriano utilizado foi o SBP 09/10, amostra de campo obtida de vacas com mastite e a preparação do inóculo foi efetuada segundo a descrição de alguns pesquisadores, com modificações (Bannerman et al., 2004; Almeida et al., 2005; Martins

Filho, 2006). A bactéria liofilizada foi inoculada em *Brain Heart Infusion* e incubada a 37°C por 15h. Posteriormente, 1 mL deste inóculo foi adicionado à 9 mL de água peptonada 0,1% (10^{-1}), e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Alíquotas (10 μ L) de cada diluição foram semeadas, pelo método em superfície, em ágar sangue (AS) ovino 5%, em duplicata, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (Martins Filho, 2006). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Uma alíquota de 100 μ L da diluição 10^{-4} foi adicionada à 5 mL de salina esterilizada 0,85%, alcançando, nesse volume total, aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC do *S. aureus*. A glândula anterior esquerda (AE) de todos os animais foi inoculada com 5 mL de salina contendo $1,0 \times 10^3$ UFC e a contralateral (AD) com 5 mL de salina esterilizada 0,85% (controle). Alíquotas do inóculo aplicado foram encaminhadas ao laboratório para avaliar pureza, viabilidade e UFC/mL.

4.4 Coleta de leite para cultura, contagem de *S. aureus* e CCS

As coletas de leite para cultura foram diárias, após realização dos testes de caneca telada e CMT. As amostras, obtidas de forma asséptica, foram coletadas de todas as glândulas após higienização do esfíncter da teta com algodão embebido em álcool 70%. A cultura foi realizada inoculando-se 30 μ L de leite em placas de AS ovino 5%. As placas foram incubadas a 37°C por 48h e o crescimento e identificação realizados segundo Quinn et al., (1994). No período pós-inoculação, as amostras de leite da glândula AE, foram utilizadas adicionalmente para contagem de *S. aureus*, realizada pelo método em superfície.

Nos dias D1 e D2 (pré-inoculação) e D4, D6, D8, D10, D12 e D14 (pós-inoculação), a glândula AE foi ordenhada completamente (ordenha manual) para a CCS pelo método eletrônico (CECS). Após a homogeneização da amostra, a alíquota coletada foi colocada em frasco apropriado com o conservante Bronopol®. A CCS foi realizada pelo método de citometria de fluxo utilizando o equipamento Fossomatic 5000 Basic® (FOSS Electric A/S. HILLEROD, Denmark). O aparelho foi calibrado com leite bovino.

4.5 Avaliação da resposta localizada e sistêmica à inflamação

A resposta sistêmica foi avaliada por alterações nos parâmetros apetite, temperatura retal e produção da glândula AE. A resposta localizada foi verificada pela aparência/consistência da glândula, aparência da secreção láctea e CCS (Tabela 1).

Escores foram utilizados para graduar alguns aspectos avaliados e mensurar o grau de severidade da mastite (Tabela 1). Esse sistema de escores foi baseado no estudo de

Atalla et al. (2009), com modificações. Para interpretação da CCS foi utilizada a classificação rotineiramente utilizada pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite credenciados junto ao Ministério da Agricultura na análise da qualidade do leite bovino cru refrigerado. Neste experimento a mesma classificação foi utilizada para o leite bubalino. Considerou-se contagens inferiores a 200.000 CS/mL como negativas, entre 200.000 – 300.000 CS/mL como indeterminadas e superiores a 300.000 como suspeitas. Para o CMT utilizou-se cinco escores (negativo; traços; 1+; 2+ e 3+), segundo recomendação de Radostitis, Leslie & Fetrow (1994). O CMT não foi utilizado para avaliar a severidade da mastite, optou-se pela CCS.

Tabela 1 – Critérios utilizados para avaliar a severidade da mastite em vacas e búfalas pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) na glândula AE

Variável	Critério	Escore
Temperatura retal (°C)	até 39,1	0
	39,2 – 39,5	1
	≥ 39,6	2
Produção de leite	sem queda	0
	≤ 20%	1
	21 – 40%	2
	41 – 60%	3
	≥ 61%	4
Apetite	normal/fisiológico	0
	comeu pouco	1
	não comeu	2
Glândula ¹	normal/fisiológica	0
	edemaciada	1
	lesão ulcerativa ²	2
Aparência da secreção	normal/fisiológica	0
	cor normal/flocos	1
	cor alterada/seroso	2
CCS	negativo	0
	indeterminado	1
	suspeito	2

¹Aparência e consistência. ² Secreção serosanguinolenta, evoluindo para purulenta.

4.6 Análise estatística

Foi realizada uma Análise de Correlação de Pearson para determinar o grau de associação entre as variáveis de interesse. Foi realizada uma Análise de Variância para analisar as diferenças entre as espécies antes e depois da inoculação para os diferentes parâmetros quantitativos avaliados. As médias foram comparadas pelo Teste de Tuckey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* *STATISTICA* versão 8 (StatSoft, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) induziu mastite clínica superaguda em todos os animais. O patógeno foi recuperado de todas as glândulas desafiadas, e as glândulas controle permaneceram livres da infecção ao longo do período experimental. Não foi observada diferença significativa entre as duas espécies para o percentual de positividade à cultura bacteriana ($p > 0,05$), nos dias D4 a D14. Quando esta mesma análise foi realizada considerando apenas o 30º dia pós-inoculação, houve diferença significativa ($p < 0,001$), sendo que o percentual de bovinos positivos foi de 50% e de bubalinos de 8,33% (Figura 1).

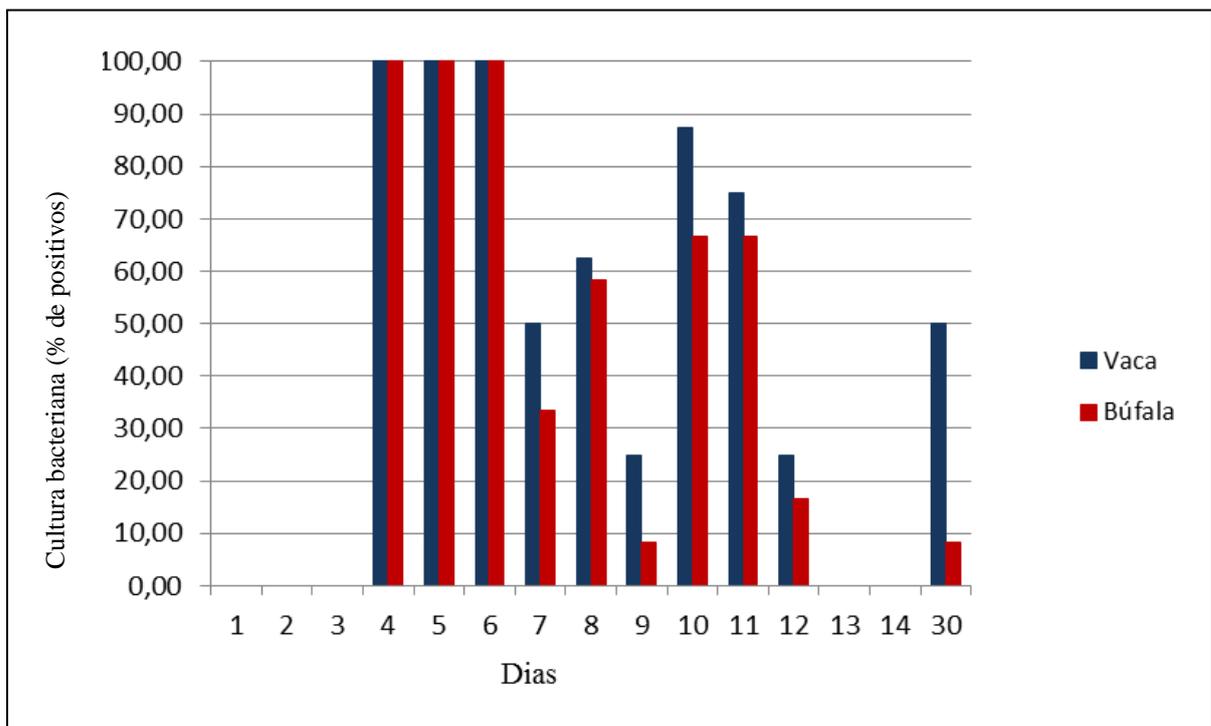


Figura 1 - Cultura bacteriana do leite do quarto AE de vacas e búfalas após a inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) nos diferentes dias do experimento.

A literatura relata diferentes números de UFC de *S. aureus* inoculados em vacas, com diferentes intensidades de resposta inflamatória, porém em búfalas, estas informações não foram encontradas. A indução de mastite subclínica foi obtida por Martins Filho et al. (2007) utilizando 500 UFC, com isolamento bacteriano, nas 72h pós-inoculação, em 63,3% dos quartos inoculados. Mastite clínica, com isolamento bacteriano em 100% dos animais inoculados, foi obtida por Atalla et al. (2009) utilizando 5.000 UFC e por Bannerman et al. (2004), utilizando 74 UFC. Petzl et al. (2008), relataram casos clínicos e subclínicos por inoculação de 10.000 UFC com recuperação do *S. aureus* de 100% dos animais e em 41,6% e 66,6% das glândulas inoculadas, respectivamente nas 24 e 72h pós-inoculação. Schukken et al. (1999), com a inoculação de 600 UFC alcançaram uma proporção de quartos e vacas infectadas de 51,3% e 79,3%, respectivamente. Esses experimentos foram realizados em vacas Holandesas. Almeida et al. (2005) induziram mastite clínica, utilizando em vacas mestiças (Holandês x Zebu), 10.000 UFC, com recuperação da bactéria inoculada de todos animais.

No presente experimento, foi instituído tratamento antimicrobiano intramamário (D6, D7 e D8) em todas as glândulas inoculadas com a bactéria para evitar exacerbação das manifestações clínicas. O tratamento foi realizado com 250 mg de gentamicina (Gentocin® - Coopers, distribuído por Clivapec, Presidente Prudente, SP, Brasil), que *in vitro* teve ação satisfatória. Nos dias seguintes à instituição do tratamento houve uma redução no número de animais positivos à cultura, com isolamento sempre menor nas búfalas. Nos dias 13 e 14 a bactéria não foi mais recuperada, porém voltou a ser isolada no 30º dia pós-inoculação.

Walker et al., (2011), ao analisarem quartos mamários naturalmente infectados perceberam uma grande variação no isolamento bacteriano, entre as vacas e em um mesmo animal. Atalla et al. (2009), detectaram eliminação intermitente e cíclica do patógeno no leite. Esse fenômeno, além da resposta diferenciada ao tratamento antimicrobiano, poderiam explicar a diferença entre os percentuais de isolamento no trigésimo dia, entre as duas espécies. Diferenças imunológicas também poderiam justificar esse resultado. Alguns pesquisadores detectaram particularidades na espécie bubalina que dificultariam a permanência do patógeno, como maior concentração de lactoferrina e lisozima (Bhatia & Valsa, 1994; Sahoo, More & Singh, 2006) e 23% mais lactoperoxidase que o leite de vaca (Kumar & Bathia, 1994).

Tolerância e resistência são duas estratégias distintas que conferem aos animais a capacidade de combater o patógeno. Segundo Detilleux (2011), estas estratégias podem

apresentar diferenças em decorrência da dinâmica evolutiva. O patógeno inoculado no experimento em questão, foi isolado de casos de mastite bovina. Pode-se sugerir uma maior adaptação da bactéria à esta espécie animal ou ainda uma intolerância maior da espécie bubalina em relação ao isolado utilizado, o que poderia estar contribuindo com a maior persistência do *S. aureus* no tecido glandular mamário bovino.

O isolamento da bactéria no 30º dia pós-inoculação reflete a característica da espécie bacteriana que possui grande capacidade invasiva, propriedades que permitem a instalação em camadas profundas da glândula mamária e a invasão das linhas celulares do epitélio mamário, persistindo dentro das células como subpopulações que crescem lentamente, contribuindo para a cronicidade do processo (Bayles et al., 1998; Boulanger, Bureau & Lekeux, 2006).

A análise da contagem de *S. aureus* no leite evidenciou que não houve diferença estatística entre o Log10 (UFC/mL) de vacas e búfalas ($p>0,05$) ao longo do período experimental. Contudo observou-se uma considerável variabilidade dos resultados, de acordo com o desvio padrão calculado, em todos os dias de experimento, nas duas espécies animais (Figura 2).

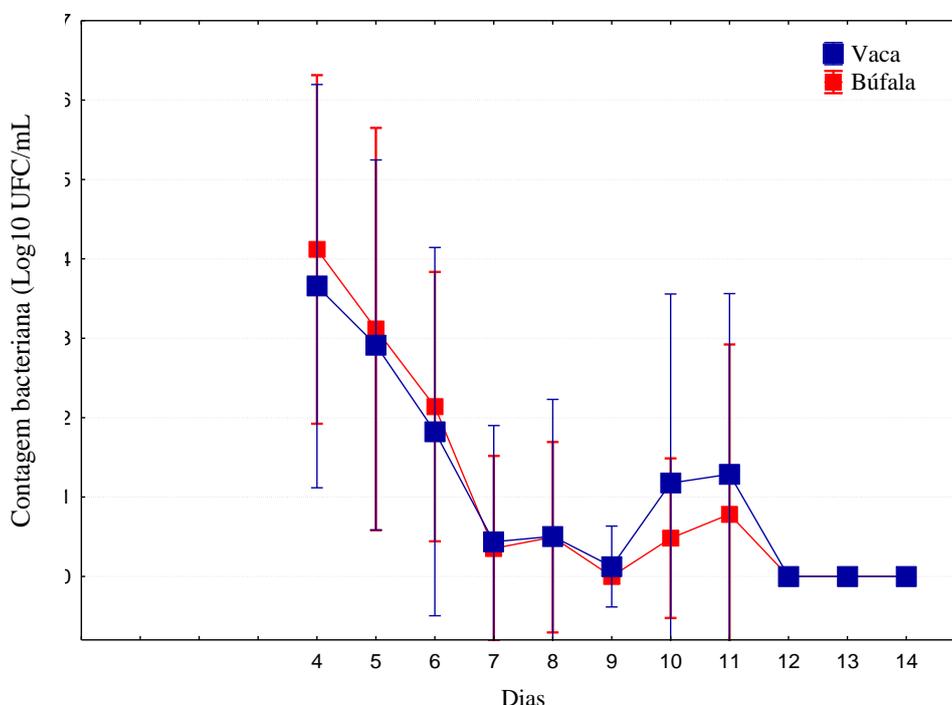


Figura 2: Contagem bacteriana (Log10 UFC/mL) e desvio padrão do quarto AE de vacas e búfalas após a inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) nos diferentes dias do experimento.

Bannerman et al. (2004) acompanharam a carga bacteriana (Log₁₀ de UFC/mL) durante 10 dias pós-inoculação de *S. aureus* em glândulas mamárias de vacas Holandesas. Na maioria dos momentos amostrados, os pesquisadores encontraram médias superiores de UFC/mL de leite quando comparadas ao estudo em questão, apesar do menor número de bactérias inoculadas (74 UFC).

Nas 24h pós-inoculação, 87,5% (7/8) dos quartos mamários das vacas e 91,6% (11/12) dos quartos mamários das búfalas, inoculados com *S. aureus*, apresentaram reação ao CMT. A reação foi menos intensa nas vacas (37,5%) do que nas búfalas, que apresentaram um percentual de CMT 3+ duas vezes maior (75%) ($p < 0,05$). Nas 48h pós-inoculação todos animais apresentaram reação inflamatória detectável por este teste, sendo que as vacas mantiveram esse perfil até o final do experimento. No último dia de aferição, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os percentuais de CMT 3+ (Freq_{média} =54%), contudo houve diferença estatística nos resultados negativos entre as duas espécies ($p < 0,05$). Nos bovinos, nesse dia, não foi verificado resultado negativo ao CMT, enquanto nos bubalinos este resultado foi encontrado em 50% dos animais.

Os resultados ao CMT de vacas são semelhantes aos relatados por Martins Filho (2006). Nas 24h, 48h e 11º dia pós-inoculação, o autor registrou, respectivamente, 62%, 100% e 100% de reação por dia em glândulas de vacas Holandesas inoculadas com 500 UFC de *S. aureus*.

Na Tabela 2 encontra-se a distribuição das amostras de leite obtidas da glândula AE em função da espécie, da CCS e dos dias de coleta. Observar que no D14 (11 dias pós-inoculação) as amostras não foram analisadas na sua totalidade devido a grande alteração no leite que impossibilitou a avaliação pelo contador eletrônico de CS. Esse valor chegou à 50% nas vacas (4/8) e 16,6% nas búfalas (2/12) (Tabela 2).

A CCS foi realizada nos dias 1 e 2 (pré-inoculação), 24h pós-inoculação (D4) e posteriormente a cada 48h. Observou-se um aumento ($p < 0,05$) na CCS após a inoculação tanto em vacas quanto em búfalas. Nas 24h pós-inoculação (D4), apesar de todos animais apresentarem contagens superiores à 300.000 CS/mL, a contagem nas búfalas, foi significativamente maior que a contagem nas vacas ($p < 0,001$). Observando a Tabela 2, percebe-se a maior persistência da resposta inflamatória nas vacas. As búfalas apresentaram, no último dia do experimento, 50% das glândulas avaliadas com contagens iguais ou inferiores a 300.000 CS/mL de leite enquanto 100% das glândulas avaliadas das vacas apresentavam contagens superiores à 300.000 CS/mL, sendo observada diferença ($p < 0,01$) entre as duas espécies.

Tabela 2 - Distribuição das amostras de leite da glândula AE de acordo com a espécie (frequência, %), CCS e dias de coleta, considerando-se < 200.000 como negativo, entre 200.000 – 300.000 como indeterminado e > 300.000 como suspeito

Amostra	Dias							
	1	2	4	6	8	10	12	14
Vaca	N=8	N=8	N=8	N=4	N=4	N=4	N=5	N=4
< 200.000	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200.000 - 300.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
> 300.000	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Búfala	N=12	N=12	N=12	N=8	N=8	N=7	N=9	N=10
< 200.000	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,11	20,00
200.000 - 300.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,11	30,00
> 300.000	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	77,78	50,00

Existem vários métodos para a mensuração de células somáticas do leite, como CMT, WMT (*Wisconsin Mastitis Test*), contagem eletrônica e contagem microscópica, considerado o método de referência (Radostitis, Leslie & Fetrow, 1994; Fonseca & Santos, 2000; Bhutto, Murray & Woldehiwet, 2012). Segundo Philpot (1998), as células somáticas possuem dois papéis importantes, combater o micro-organismo causador da doença e reparar os tecidos secretores danificados. Sua concentração é influenciada por vários fatores, sendo o *status* de infecção o mais importante (Amaral et al., 2005). A presença de altas contagens de CS demonstra que o patógeno estimulou a liberação de citocinas provocando migração transepitelial de leucócitos e/ou que existe tecido danificado que precisa ser reparado (Sordillo, Shafer-Weaver & Derosa, 1997; Abbas & Lichtman, 2007). Pôde-se constatar neste estudo que, entre vacas e búfalas, não houve diferença estatisticamente significativa nas culturas de leite e na contagem bacteriana até o 11º dia pós-inoculação, porém houve diferença nos resultados de CMT e CCS. As búfalas reagiram mais intensamente aos testes logo após a indução, porém com uma menor persistência. Estes resultados sugerem diferenças, entre as duas espécies animais, na estimulação e/ou ação de citocinas ou diferenças no grau de tecido glandular danificado pelo *S. aureus*.

A cinética das células somáticas analisadas pelo CMT e pelo Log10 da contagem eletrônica pode ser vista na Figura 3. Observa-se a correlação entre os dois testes que teve sua significância confirmada pela análise estatística ($p < 0.001$) ($r = 0,90$ para as vacas e $r = 0,94$ para as búfalas).

Foi realizado o teste de correlação de Pearson entre o percentual de positivos para cultura bacteriana e o percentual de positivos pelo teste CMT e CCS. Ambos testes apresentaram correlação com a cultura bacteriana ($p < 0,001$). Ao CMT, o coeficiente de correlação foi de 0,56 para as vacas e 0,48 para as búfalas e à CCS, de 0,68 para as vacas e de 0,70 para as búfalas. Comparando estatisticamente os coeficientes de correlação das duas espécies, não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os valores.

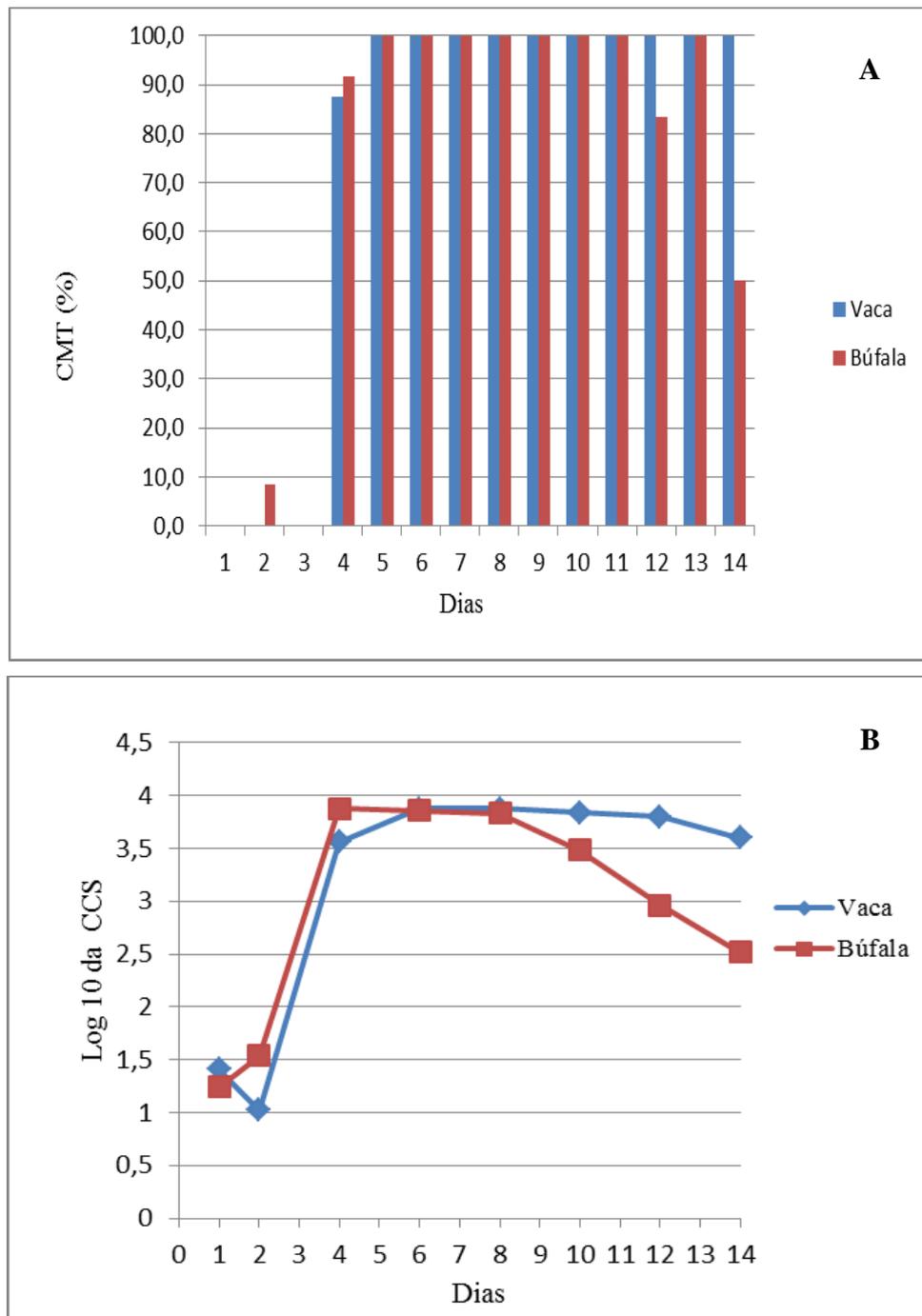


Figura 3: Relação entre o percentual de positivos pelo teste CMT (A), e o Log₁₀ da CCS (B), pré e pós-inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE de vacas e búfalas, nos diferentes dias do experimento.

O método mais utilizado para detecção da mastite nas diferentes espécies animais é a CCS e os resultados encontrados nesse trabalho revelaram uma associação entre cultura qualitativa, CMT e CCS, sem diferença significativa entre os coeficientes de correlação das duas espécies animais. Essa associação já foi amplamente estudada em vacas (Bannerman et al., 2004; Bhutto, Murray & Woldehiwet, 2012) e apresenta divergências nos trabalhos realizados em búfalas (Cerón-Muñoz et al., 2002). Trabalho desenvolvido por Carvalho et al. (2007) indicou que o CMT não é um bom teste para detecção de mastite subclínica em bubalinos e Amaral et al. (2005) chamaram atenção aos valores diminutos de células somáticas no leite de búfalas infectadas quando comparados com o leite de bovinos. Jorge et al. (2005), encontraram uma correlação positiva e significativa entre CCS e CMT, que também foi detectada no presente experimento e Moroni et al. (2006) encontraram uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 99,1% entre contagem eletrônica de células somáticas e cultura de leite bubalino. Verificaram que cem por cento dos quartos mamários com contagens acima de 200.000 apresentavam infecção intramamária. Resultado semelhante foi verificado por Dhakal (2006). Medeiros et al. (2011), avaliando búfalas da Região Nordeste do Brasil, observaram que as amostras de leite positivas no exame microbiológico apresentaram CCS entre 280.000 e 401.000 CS/mL. Reza et al. (2011) descreveram uma sensibilidade do CMT para bubalinos de 70% na detecção de patógenos maiores da mastite.

A CCS, juntamente com os parâmetros aparência da secreção láctea, aparência/consistência da glândula, produção, apetite e temperatura retal foram utilizados para mensurar a severidade da mastite, que tem sua representação gráfica na Figura 5. Nos dias que precederam a indução, todos os animais e todas as glândulas encontravam-se livres de qualquer alteração nos parâmetros utilizados para compor a severidade do processo inflamatório.

A aparência da secreção láctea foi avaliada por meio do emprego da caneca telada. A Figura 4 mostra que 24h pós-inoculação o leite da glândula AE apresentou alteração visual em um pequeno percentual de vacas (12,5%) e búfalas (16,6%). Nas vacas, alteração máxima foi detectada nos dias D8 e D12, e nas búfalas, no D7. Ao final do experimento, 75% das vacas e 33,3% das búfalas encontravam-se com alterações visuais na secreção, verificando-se diferença entre as duas espécies ($p < 0,05$). Ao analisar as características da secreção, foram considerados três escores (Tabela 1). O escore 3 foi aplicado à alteração mais severa, leite seroso e/ou coloração alterada. O percentual de animais que apresentou este escore foi diferente entre as espécies ($p < 0,05$), sendo detectado em 57,97% e 37,03% das amostras de leite que demonstraram alteração visual, respectivamente em vacas e búfalas.

Almeida et al. (2005) detectaram alterações visuais no leite nas 24h pós-inoculação de 10.000 UFC na glândula mamária de vacas mestiças (Zebu x Holandês). As alterações foram mais intensas entre 3º e 9º dias. Atalla et al. (2009) encontraram 20% de glândulas mamárias de vacas Holandesas inoculadas com 5.000 UFC de variadas cepas de *S. aureus*, com alteração visual na secreção láctea. Petzl et al. (2008), utilizando 10.000 UFC induziram alteração visual no leite, nas primeiras 24h pós-inoculação, em 25% dos animais inoculados.

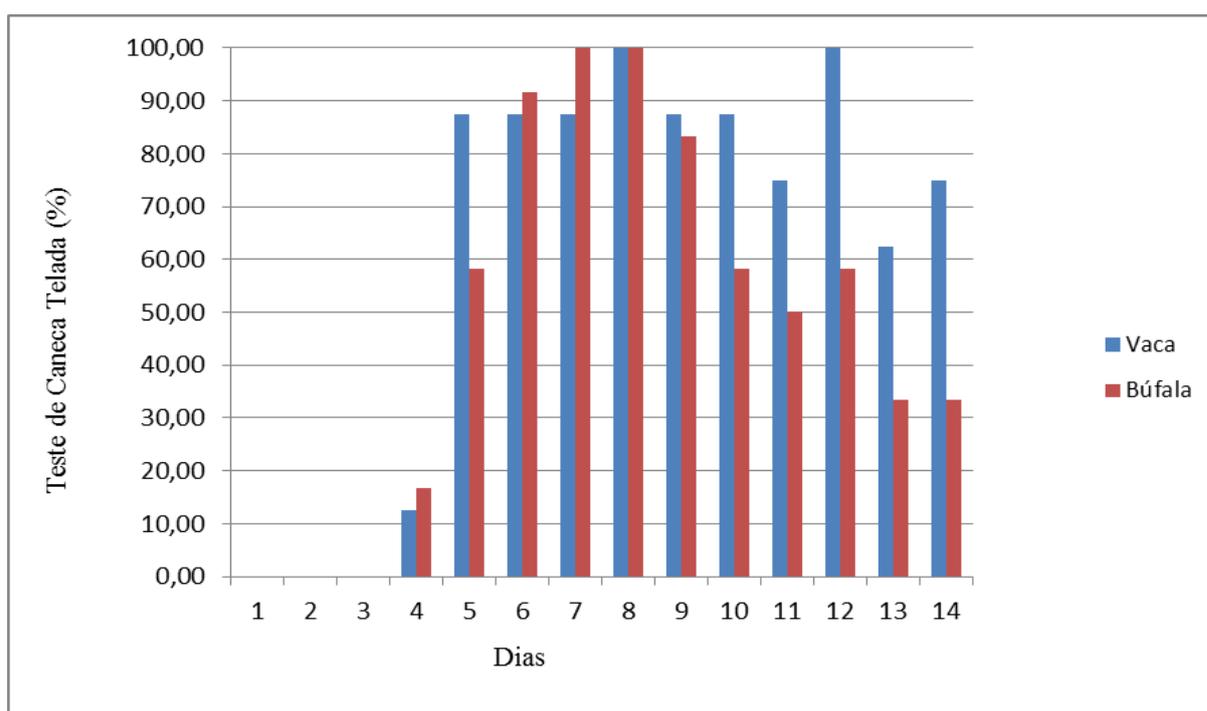


Figura 4: Percentual de vacas e búfalas com o quarto AE positivo na caneca telada, pós-indução de mastite por inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10), nos diferentes dias de amostragem do leite.

A aparência do leite está relacionada a danos do tecido glandular mamário e/ou alterações no endotélio vascular, que por sua vez dependem dos fatores de virulência da bactéria e reações imunes do hospedeiro (Zhao & Lacasse, 2008). A bactéria inoculada era grande produtora de alfa toxina, verificado pela ampla área de hemólise completa em AS e apresentava o superantígeno SED (enterotoxina estafilocócica do tipo D). Os fatores de virulência anteriormente citados, são exemplos de moléculas que contribuem para a alteração visual da secreção láctea. A alfa toxina por causar danos nos vasos sanguíneos leva à necrose coagulativa isquêmica do tecido adjacente (Timoney et al., 1988) e a enterotoxina induz à produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias que provocam uma resposta local pela migração transepitelial de leucócitos, principalmente neutrófilos (Raulo et al., 2002; Abbas & Lichtman, 2007). O aumento exagerado destas células provoca formação de coágulos lácteos

e em locais com intensa presença da bactéria poderá ocorrer a formação de abscessos (Gyles et al., 2010). Os resultados deste estudo revelaram que as búfalas foram capazes de recuperar o aspecto fisiológico do leite com maior rapidez e as alterações verificadas durante o período experimental foram mais intensas na espécie bovina.

Alteração no parâmetro aparência/consistência da glândula foi percebida 48h pós-inoculação em 16,7% e 12,5% das búfalas e vacas, respectivamente. Ao longo do período experimental, todas as vacas apresentaram consistência alterada de glândula e até o D14, um animal apresentou lesão ulcerativa serosanguinolenta que evoluiu para purulenta. Avaliação realizada trinta dias pós-inoculação revelou um segundo animal com lesão semelhante. O percentual máximo de búfalas com alteração de aparência/consistência foi de 83,3% e nenhuma desenvolveu lesão ulcerativa.

A principal alteração observada na glândula foi o edema, provocado pela intensa resposta inflamatória induzida por fatores bacterianos (Trabulsi & Alterthum, 2005). Lesões ulcerativas não são comuns em mastites provocadas por *S. aureus*, porém Timoney et al. (1988) descreveram esta forma mais grave principalmente em novilhas de primeira cria, em início de lactação. A gravidade da mastite está relacionada, entre outros fatores, à cepa bacteriana. Leeuwen et al. (2005) e Contreras & Rodríguez (2011) citaram isolados capazes de produzir superantígenos, indutores de uma resposta por citocinas pró-inflamatórias e normalmente presentes em casos de mastite gangrenosa. Gravet et al. (1998) relacionaram as toxinas bi-componentes com as lesões necrotizantes provocadas por esta espécie bacteriana. Estes fatores justificam as alterações encontradas nas glândulas infundidas, mas não explicam a maior gravidade observada na espécie bovina.

Nas duas espécies animais o peso do leite foi menor no período pós-inoculação ($p < 0,05$). Nas primeiras 24h pós-indução, a queda foi mais perceptível nas búfalas ($p < 0,05$). Nesse dia, 41,7% das búfalas e 25% das vacas apresentaram queda de até 20% (escore 1) da produção pré-inoculação. A queda mais acentuada nas búfalas persistiu até às 72h pós-inoculação. As pesagens subsequentes revelaram leve recuperação na produção das búfalas e no último dia do experimento, um animal havia recuperado sua produção original, 41,7% apresentavam redução de até 20% (escore 1) e 25%, redução superior à 61% (escore 4). Nas vacas observou-se um comportamento diferente. Elas iniciaram com uma queda de produção mais branda mas que foi se agravando ao longo do período de observação. Todas as vacas, no último dia do experimento, apresentavam queda de produção, estando a maioria delas (62,5%) com redução superior à 61% (escore 4) ($p < 0,05$).

Atalla et al. (2009) relataram que vacas desafiadas com 5.000 UFC de *S. aureus* apresentaram queda moderada e/ou severa de produção de leite, porém não citaram percentuais de redução. Bannerman et al. (2004) encontraram uma redução de 21,10% na produção de leite em vacas que tiveram uma glândula infundida com 74 UFC de *S. aureus*. Petzl et al. (2008), relataram queda de produção de 50% nas primeiras 12h, em vacas desafiadas com 10.000 UFC, com estabilização da produção em 70% do período pré-inoculação nas três semanas subsequentes. Todas estas induções foram realizadas em vacas da raça Holandesa.

O apetite não mostrou-se alterado no primeiro dia pós-inoculação (D4). Nas 48h, 50% das vacas não se alimentaram (escore 2) durante a ordenha e, 12,5% apresentaram apetite diminuído (escore 1). Nesse dia, 50% das búfalas continuaram se alimentando adequadamente e o restante apresentou queda no apetite (escore 1). Nas 72h pós-desafio da glândula AE, o apetite estava prejudicado em 62,5% das vacas e em 41,7% das búfalas. Nos dias subsequentes, até o último dia do experimento (D14), houve uma alternância de vacas e búfalas apresentando alterações no apetite.

Da mesma forma que a queda de produção e a alteração de apetite, a elevação da temperatura retal foi utilizada como parâmetro de avaliação sistêmica. A bactéria inoculada foi capaz de desencadear febre, um mecanismo importante no combate ao agente patogênico (Trabulsi & Alterthum, 2005).

Dois dias pós-inoculação (D5), a temperatura retal encontrava-se elevada em 100% das vacas e 83,3% das búfalas. Em 87,5% das vacas e 80% das búfalas, a temperatura foi superior à 39,6°C (escore 2). Todas as vacas e 91,6% das búfalas alcançaram o escore máximo de temperatura, 72h pós-inoculação. No quinto (D8) e sétimo dias (D10), todas as vacas e búfalas, retornaram à temperatura fisiológica.

Bannermann et al. (2004) detectaram elevação de temperatura retal em vacas com mastite induzida por *S.aureus* a partir das 32h pós-infecção. A temperatura máxima registrada foi de 39,4°C. Atalla et al. (2009) observaram durante cinco dias animais inoculados com *S. aureus* e registraram elevação de temperatura em 60% deles. Este efeito sistêmico não foi detectado por Petzl et al. (2008) e por Martins Filho et al. (2007) pós-indução de mastite por inoculação de *S.aureus*.

A Figura 5 mostra a média dos escores em dias pré-determinados, em vacas e em búfalas. Foram representados graficamente somente os dias onde todos os parâmetros foram medidos.

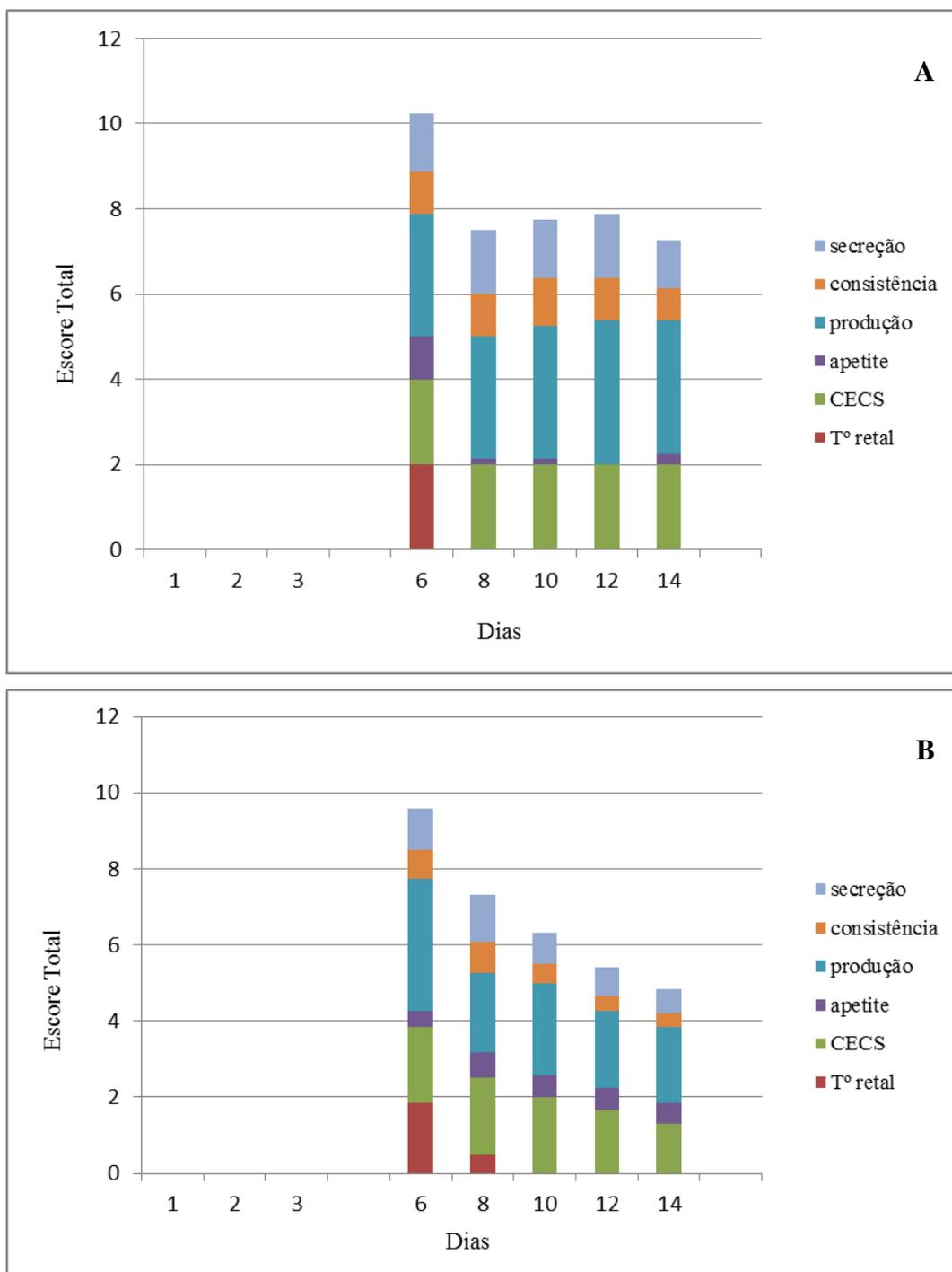


Figura 5 - Média do escore total bovino (A) e bubalino (B) pós-inoculação intramamária de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE de vacas e búfalas, nos diferentes dias do experimento.

Nota-se na referida Figura, que o rebanho bovino ultrapassou o escore total 10, nas 72h pós-inoculação. Isto ocorreu devido as alterações mais intensas observadas na maioria dos parâmetros avaliados. Do D8 ao D14, percebe-se pela observação da Figura 5, uma melhora constante no rebanho bubalino e uma persistência do quadro no rebanho bovino.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre vacas e búfalas, em relação ao escore dos parâmetros da resposta localizada e da resposta sistêmica. No D14 o escore total

das vacas foi de 7,25 e das búfalas de 4,85 ($p < 0,05$). Nesse dia, um maior percentual de vacas apresentava contagens de CS superiores ao fisiológico, secreção láctea com aparência alterada e alteração na aparência/consistência da glândula. A temperatura retal, em ambas espécies, encontrava-se dentro dos limites fisiológicos, o apetite encontrava-se alterado em um maior percentual de búfalas e a produção da glândula AE diminuída em todo rebanho bovino. Um maior percentual de vacas, apresentava, nesse dia, redução superior a 61% da produção original da glândula AE.

6 CONCLUSÕES

A inoculação intramamária de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) é capaz de provocar mastite clínica superaguda nas espécies bovina e bubalina, com maior persistência da bactéria na glândula mamária bovina e com resposta mais rápida e menos duradoura do processo inflamatório na espécie bubalina. Há diferenças na fisiopatologia da mastite entre as duas espécies, pelas alterações locais e sistêmicas mais severas e persistentes na espécie bovina. As bubalinas apresentam uma maior velocidade de recuperação dos parâmetros de avaliação da resposta localizada à inflamação e da resposta sistêmica à inflamação, demonstrando superioridade no combate ao agente infeccioso. Nas duas espécies, os testes de CMT e CCS apresentam correlação com a cultura bacteriana do leite.

7 AGRADECIMENTOS

À UPIS, por disponibilizar as búfalas e o local para o desenvolvimento do experimento; ao Laboratório de Bacteriologia do Depto de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo isolamento e doação da bactéria inoculada; ao Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela realização da CECS e ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (MG) pela pesquisa do perfil enterotoxigênico e do potencial para produção de TSST-1 no *S. aureus* utilizado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1-6, 2005.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.

ARAÚJO, D.K.G; GHELLER, V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

ATALLA, H.; GYLES, C.; WILKIE, B.; MALLARD, B. et al. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. **Veterinary Microbiology**, n.137, p. 326-334, 2009.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.

BASTOS, P.A.S.; BIRGEL, E.H. Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV – SP**, v. 9, n. 3, p. 06-13, 2011.

BAYLES, K.W.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and Immunity**, n. 66, p. 336-342, 1998.

BHATIA, K.L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo Milk. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 162-164, 1994.

BHUTTO, A.L.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWET, Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, n. 92, p. 13-17, 2012.

BOULANGER, D.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Invasion intracellulaire des cellules non-phagocytaires par *Staphylococcus aureus*. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 150, n. 1, p. 27-42, 2006.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2 ed., Porto Alegre: ArtMed, 1998. 672p.

CARVALHO, L.B. **Padrão de infecção intramamária em búfalas (*Bubalus bubalis*) da região do alto São Francisco-MG**. 2005. 37f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.

CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

CASSOL, D.M.; SANDOVAL, G.A.F.; PERÍCOLE, J.J. et al. Mastite bovina. **A Hora Veterinária**, n. 175, p. 10-14, 2010.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 324, p. 8-10, 2002.

CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUES, J.M. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, n. 16, p. 339 – 356, 2011.

DETILLEUX, J.C. Effectiveness analysis of resistance and tolerance to infection. **Genetics Selection Evolution**, v. 43, n. 9, p. 1 – 10, 2011.

DHAKAL, I. P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, n. 2, p. 81-86, 2006.

ESCRIVÃO, S.C.; GHELLER, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Avaliação clínica, ultrasonográfica e telescópica das papilas mamárias de búfalas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 25-29, 2008.

FAO (**Food and Agriculture Organization**), [2010]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>. Acesso em: 25 jun. 2012.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FRANCISCIS, G.; DIPALO, R. Buffalo Milk production. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 137-145, 1994.

- GRAVET, A.; COLIN, D.A.; KELLER, D.; GIRADOT, R. et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. **FEBS Letters**, n. 436, p. 202-208, 1998.
- GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell, 2010. 643p.
- HERNANDEZ, J.A.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; SANTOS, J.E.P. Observed and expected combined effects of clinical mastitis and low body condition on pregnancy loss in dairy cows. **Theriogenology**, n. 77, p. 115-121, 2012.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. California: Blackwell Science, 1999. 479p.
- JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B. et al. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.
- KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N.R. Análise microbiológica, teste de tamis e California mastitis test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 179-183, 2005.
- KARLSSON, A.; ARVIDSON, S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. **Infection Immunology**, n. 70, p. 4239-4246, 2002.
- KUMAR, R.; BATHIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1994, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 2009-2220, 1994.
- LE MARÉCHAL, C.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LOIR, Y.L. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review. **Dairy Science & Technology**, n. 91, p. 247 – 282, 2011.
- LE MARÉCHAL, C.; SEYFFERT, N.; JARDIN, J. et al. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. **Plos ONE**, v. 6, n. 11, p. 1 – 10, 2011a.
- LEEUWEN, W.B.V.; MELLES, D.C.; ALAIDAN, A. et al. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4584 - 4591, 2005.
- MARTINS FILHO, L.P. **Inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923) em vacas leiteiras: estudo clínico, laboratorial e terapêutico**. 2006, 74f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- MARTINS FILHO, L.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CESCO, F.T.R.S. et al. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação

intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **ARS Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2007.

MEDEIROS, E.S.; BARBOSA, S.B.P; JATOBÁ, R.B. et al. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 219-223, 2011.

MORONI, P.; ROSSI, C.S.; PISONI, G. et al. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, n. 89, p. 998-1003, 2006.

NAPOLI, A.; AIELLO, D.; DI DONNA, L. et al. Exploitation of endogenous protease activity in raw mastitic milk by MALDI-TOF/TOF. **Analytical Chemistry**, n. 79, p. 5942-5948, 2007.

OLIVEIRA, L.; RODRIGUES, A.C.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 10, p. 1361-1368, 2011.

OTE, I.; TAMINIAU, B.; DUPREZ, J.N. et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, n. 153, p. 285-292, 2011.

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J. et al. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, v. 39, n. 2, p. 1-23, 2008.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, Curitiba: 1998. **Anais...** Curitiba: [S.N.], p. 28-35, 1998.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, n. 34, p. 565-578, 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Europa: Wolf, 1994. 648p.

RADOSTITIS, O.M.; LESLIE, K.E.; FETROW, J. Mastitis control in dairy heard. In: Radostitis, O.M.; Leslie, K.E.; Fetrow, J. **Herd Health Food Animal Production Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 229-276.

RAULO, S.M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, T. et al. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 85, p. 137-145, 2002.

REED, S.B.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E. et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. **Infection Immunology**, n. 69, p. 1521-1527, 2001.

REZA, V.H.; MEHRAN, F.M.; MAJID, M.S.; HAMID, M. Bacterial pathogens of intramammary infections in Azeri buffaloes of Iran and their antibiogram. **African Journal of Agriculture Research**, v. 6, n. 11, p. 2516-2521, 2011.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos da Imunologia**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004. 489p.

SAHOO, G.; MORE, T.; SINGH, V.K. A comparative study on certain enzymes of the granulocyte from different ruminant species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 319-325, 2006.

SCHUKKEN, Y.H.; LESLIE, K.E.; BARNUM, D.A. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. **Journal of Dairy Science**, n. 82, p. 2393-2401, 1999.

SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M. et al. Impact of acute clinical mastitis on cow behavior. **Applied Animal Behavior Science**, n. 132, p. 101-106, 2011.

SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell count in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137, 1994.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

STATSOFT, INC. **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0, 2007. www.statsoft.com.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8 ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1988. 951p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRIPALDI, C.; PALOCCI, G.; MIARELLI, M. et al. Effects of mastitis on buffalo milk quality. **Asian-Australasian Journal of Animals Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1319-1324, 2010.

WALKER, J.B.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; WALKER, W.L. et al. Variation in daily shedding patterns of *Staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1114-1122, 2011.

WEDHOLM, A.; MOLLER, H.S.; LINDMARK-MANSSON, H. et al. Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cell counts using LC MALDI MS/MS detection. **Journal of Dairy Research**, n. 75, p. 76-83, 2008.

WICKSTROM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MANSSON, H. et al. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, n. 76, p. 195-201, 2009.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis : causes and control. **Journal of Animal Science**, n. 86, p. 57-65, 2008.

CAPITULO 4

**RESPOSTA IMUNE INATA E SEVERIDADE DA MASTITE CLÍNICA PÓS-
INOCULAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACAS E DE BÚFALAS COM
Staphylococcus aureus (SBP 09/10)**

1 RESUMO

As citocinas e as células somáticas do leite, fatores solúveis e celulares da imunidade inata, respectivamente, são fundamentais e estão presentes nos processos inflamatórios da glândula mamária. Este experimento teve por objetivo analisar em vacas (Holandês x Zebu) e em búfalas (Murrah), submetidas à mastite induzida por inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10), a concentração da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β)/mL de leite, a contagem de células somáticas (CCS) e a correlação com alguns parâmetros da resposta local e sistêmica à inflamação. Os animais tiveram uma glândula inoculada com aproximadamente 1000 UFC e foram monitorados por cultura bacteriológica do leite, CCS, quantificação da IL-1 β na secreção láctea pelo método ELISA, avaliação da aparência/consistência da glândula, aparência da secreção láctea (resposta localizada à inflamação) e aferição da temperatura retal (resposta sistêmica à inflamação). Houve elevação nas concentrações de IL-1 β e na CCS nas espécies bovina e bubalina. A evolução da concentração da citocina foi diferente entre as duas espécies ($p < 0,05$). As búfalas apresentaram uma elevação nos níveis de citocina mais rápida e as vacas alcançaram concentração, desta citocina, 1,57 vezes maior. Nas 24h pós-inoculação, as búfalas apresentaram uma concentração de 0,372 ng/mL e alcançaram o pico nas 48h, com 0,413 ng de IL-1 β por mililitro de leite. Ao contrário das búfalas, as vacas apresentaram um aumento menos expressivo nas 24h pós-inoculação (0,088 ng/mL) que foi aumentando e alcançou o seu pico nas 72h pós-inoculação (1,061 ng/mL). Na espécie bovina houve correlação ($p < 0,05$) entre a concentração da IL-1 β no leite, CCS, resposta localizada à inflamação e temperatura retal. As duas espécies alcançaram contagens máximas semelhantes ($p > 0,05$) de CS/mL de leite, porém com concentrações diferentes ($p < 0,05$) de IL-1 β /mL de leite, 1,061 ng/mL e 0,120 ng/mL, respectivamente para as espécies bovina e bubalina.

Palavras-chave: imunidade inata, indução de mastite, interleucina, mastite bovina, mastite bubalina, *S. aureus*.

2 ABSTRACT

Cytokines and milk somatic cells, soluble and cellular innate immunity factors, respectively, are fundamental and presented in inflammatory processes of the mammary gland. This experiment aimed to analyze in cows (Holstein x Zebu) and buffaloes (Murrah), submitted to mastitis induced by intramammary inoculation of *S. aureus* (SBP 09/10), the concentration of interleukin-1 β (IL-1 β)/mL pro-inflammatory cytokine of milk, the somatic cell count (SCC), and to verify the presence and the correlation with some parameters of local and systemic response to inflammation. The animals had one gland inoculated with approximately 1000 CFU and were monitored by culturing milk, SCC, IL-1 β quantification in the milk using ELISA and evaluation of the gland appearance/consistency and milk secretion appearance (localized response to inflammation) and rectal temperature measurement (systemic response to inflammation). There was increase in the concentrations of IL-1 β and SCC in bovine and bubaline species. The evolution of the cytokine concentration was different between the two species ($p < 0.05$). Buffaloes showed a faster increase and cows reached a concentration of this cytokine 1.57 fold higher. In 24h post inoculation, buffaloes had a concentration of 0.372 ng/mL and peaked in 48h, with 0.413 ng of IL-1 β per milk milliliter. As opposed to buffaloes, cows showed a less expressive increase in 24h post inoculation (0.088 ng/mL) which had increased and peaked in 72h post inoculation (1.061 ng/mL). In bovine species there was correlation ($p < 0.05$) between the IL-1 β concentration in milk, SCC, inflammatory localized response and rectal temperature. Both species reached similar maximum counts ($p > 0.05$) of SC/milk mL, but with different concentrations ($p < 0.05$) of IL-1 β /milk mL, 1.061 ng/mL and 0.120 ng/mL, respectively for the bovine and buffalo species.

Keywords: innate immunity, induced mastitis, interleukin, bovine mastitis, mastitis buffalo, *S. aureus*.

3 INTRODUÇÃO

A mastite é considerada a enfermidade infecto-contagiosa de maior impacto nos rebanhos leiteiros e embora possa ser provocada por inúmeros agentes, o gênero *Staphylococcus* é reconhecido como o agente isolado em maior frequência, nas diferentes espécies animais, em diversos países do mundo (Sá et al., 2004; Li et al., 2009).

Dentre as espécies de *Staphylococcus*, o *S. aureus* é considerado o mais patogênico. É uma espécie portadora de vários fatores de virulência, dentre eles, os relacionados com a indução/modulação da resposta inflamatória (lipoproteínas, peptidoglicano, ácido lipoteicóico, ácido teicóico e toxinas superantigênicas, como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e a toxina da síndrome do choque tóxico – TSST-1) (Reed et al., 2001; Karlsson & Arvidson, 2002; Rainard et al., 2008; Gyles et al., 2010; Kim et al., 2011; Ote et al., 2011).

A defesa da glândula mamária a esse e aos demais patógenos, é realizada pela imunidade inata e pela imunidade adquirida (Vaz, 2004; Rainard & Riollet, 2006). A inata, considerada a mais importante nesse tecido, é representada pelas barreiras físicas, fatores solúveis e fatores celulares (Linde et al., 2008; Tizard, 2008) e a adquirida, composta por dois ramos, a mediada por anticorpos (resposta imune-humoral) e a mediada por células (resposta imune-celular) (Tizard, 2008).

As citocinas e as células somáticas do leite, fatores solúveis e celulares da imunidade inata, respectivamente, são fundamentais na eliminação do agente infeccioso (Roitt & Delves, 2004; Araújo & Gheller, 2005). Citocinas são proteínas que mediam o crescimento celular, inflamação, imunidade, diferenciação, migração e reparo (Watson, Oliver & Khaled, 2011). Segundo Sordillo, Shafer-Weaver & Derosa (1997), as citocinas estudadas na fisiopatologia da glândula mamária são as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α). Estas citocinas são produzidas principalmente pelas

células epiteliais e pelos macrófagos e desencadeiam o processo inflamatório por alteração na permeabilidade vascular. A IL-1 β , uma das mais avaliadas na glândula mamária, é uma citocina pró-inflamatória que provoca uma resposta local pela migração transepitelial de neutrófilos, e uma resposta sistêmica, por ser uma potente indutora da febre (Abbas & Lichtman, 2007). Segundo Alluwaimi (2004), a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos destas moléculas tem contribuído consideravelmente para subsidiar o diagnóstico e terapia da mastite.

As células somáticas do leite são representadas pelos leucócitos e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna da teta (Galiero & Morena, 2000). A invasão do patógeno estimula a liberação de citocinas, por células epiteliais da glândula e macrófagos, principal célula encontrada em uma glândula mamária saudável. A elevação na contagem de células somáticas (CCS) é representada, principalmente pelo grande aporte de neutrófilos (Paape, et al., 2002; Amaral et al., 2005), e constitui parâmetro rotineiramente utilizado para avaliar a sanidade do tecido.

Historicamente as búfalas são consideradas mais resistentes à mastite em relação as vacas e alguns fatores da imunidade inata têm sido considerados como responsáveis por essa característica, como a maior concentração de pigmentos de melanina na pele, epitélio extratificado queratinoso mais espesso (Uppal et al., 1994 apud Amaral & Escrivão, 2005), morfologia do canal da teta (Seykora & MacDaniel, 1985), ácidos graxos e proteínas catiônicas específicas (Hogan et al., 1988), maior concentração de lactoferrina (Bhatia & Valsa, 1994; Franciscis & Dipalo, 1994), lactoperoxidase (Kumar & Bathia, 1994) e lisozima (Priyadarshini & Kansal, 2002; Sahoo, More & Singh, 2006). O objetivo desse trabalho, foi avaliar e correlacionar alguns parâmetros da imunidade inata (CCS, IL-1 β) com a severidade da mastite clínica, em vacas e búfalas que tiveram a glândula mamária infectada por inoculação de *S. aureus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Vinte fêmeas primíparas, 12 da espécie bubalina (raça Murrah) e 08 da espécie bovina (Holandês x Zebu), com um ou dois meses de lactação, foram avaliadas por um período de quatorze dias. Os animais foram ordenhados uma vez ao dia, com bezerro ao pé, e antes do experimento estavam livres de alterações clínicas e infecções nas glândulas mamárias, confirmado por três culturas diárias consecutivas negativas do leite, caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) negativos. O comitê de ética das Faculdades Integradas da União Pioneira de Integração Social (UPIS) aprovou o protocolo desse estudo experimental (Protocolo nº 005/10).

4.2 Organograma do experimento

O experimento foi realizado em duas etapas, pré (D1 a D3) e pós-inoculação (D4 a D14). As inoculações ocorreram no D3 e as glândulas desafiadas foram a anterior esquerda (AE) e a anterior direita (AD). A AE recebeu o inóculo de *S. aureus* e a AD foi inoculada com salina esterilizada 0,85% (controle). Durante o período experimental foram realizadas as seguintes avaliações: CCS, cultura bacteriológica do leite, contagem de *S. aureus* no leite, avaliação clínica local e sistêmica e pesquisa de IL-1 β na secreção láctea.

4.3 Preparação do inóculo e inoculação intramamária

O isolado bacteriano utilizado foi o SBP 09/10, amostra de campo obtida de vacas com mastite e a preparação do inóculo foi efetuada segundo a descrição de alguns

pesquisadores, com modificações (Bannerman et al., 2004; Almeida et al., 2005; Martins Filho, 2006). A bactéria liofilizada foi inoculada em *Brain Heart Infusion* e incubada a 37°C por 15h. Posteriormente, 1 mL deste inóculo foi adicionado à 9 mL de água peptonada 0,1% (10^{-1}), e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Alíquotas (10 μ L) de cada diluição foram semeadas, pelo método em superfície, em ágar sangue (AS) ovino 5%, em duplicata, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (Martins Filho, 2006). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Uma alíquota de 100 μ L da diluição 10^{-4} foi adicionada à 5 mL de salina esterilizada 0,85%, alcançando, nesse volume total, aproximadamente 1000 UFC do *S. aureus*. A glândula anterior esquerda (AE) de todos os animais foi inoculada com 5 mL de salina contendo 1000 UFC e a contralateral (AD) com 5 mL de salina esterilizada 0,85% (controle). Alíquotas do inóculo aplicado foram encaminhadas ao laboratório para avaliar pureza, viabilidade e UFC/mL.

4.4 Coleta de leite para cultura, contagem de *S. aureus* e CCS

As amostras de leite, obtidas de forma asséptica, foram coletadas de todas as glândulas, em todos os dias do experimento, após higienização do esfíncter da teta com algodão embebido em álcool 70%. A cultura foi realizada inoculando-se 30 μ L de leite em placas de AS ovino 5%. As placas foram incubadas a 37°C por 48h e o crescimento e identificação realizados segundo Quinn et al., (1994). No período pós-inoculação, as amostras de leite da glândula AE, foram utilizadas adicionalmente para contagem do *S. aureus*, realizada pelo método em superfície.

Em dois dias pré-inoculação (D1 e D2) e em seis dias pós-inoculação (D4, D6, D8, D10, D12 e D14), a glândula AE foi ordenhada completamente (ordenha manual) para a CCS pelo método eletrônico. Após a homogeneização da amostra, a alíquota coletada foi colocada em frasco apropriado com o conservante Bronopol®. A CCS foi realizada pelo método de citometria de fluxo utilizando o equipamento Fossomatic 5000 Basic® (FOSS Electric A/S. HILLEROD, Denmark). O aparelho foi calibrado para leite bovino.

4.5 Avaliação da resposta localizada e sistêmica à inflamação

A resposta sistêmica foi avaliada pela aferição da temperatura retal que foi realizada com termômetro digital. A aferição da temperatura foi realizada nos dias D5 a D14 e considerou-se, temperaturas de até 39,1°C, como fisiológicas (Atalla et al., 2009). A resposta

localizada foi verificada por alterações na aparência/consistência da glândula, aparência da secreção láctea e CCS. Diariamente a aparência/consistência foi avaliada por inspeção visual e palpação da glândula e a característica da secreção láctea, pela utilização da caneca telada.

Escores foram utilizados para graduar a resposta localizada à inflamação (Tabela 1). Esse sistema de escores foi baseado em Atalla et al. (2009), com modificações. Para interpretação da CCS foi utilizada a classificação rotineiramente utilizada pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite credenciados junto ao Ministério da Agricultura na análise da qualidade do leite cru refrigerado bovino. Nesse experimento a mesma classificação foi utilizada para o leite bubalino. Considerou-se contagens inferiores a 200.000 CS/mL como negativas, entre 200.000 – 300.000 CS/mL como indeterminadas e superiores a 300.000 como positivas.

Tabela 1 – Critérios utilizados para avaliar a resposta localizada à inflamação em vacas e em búfalas pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) na glândula AE

Variável	Critério	Escore
Glândula ¹	normal/fisiológica	0
	edemaciada	1
	lesão ulcerativa ²	2
Aparência da secreção	normal/fisiológica	0
	cor normal/flocos	1
	cor alterada/seroso	2
CCS	negativo	0
	indeterminado	1
	positivo	2

¹Aparência e consistência. ²Secreção serosanguinolenta, evoluindo para purulenta.

4.6 Pesquisa da IL-1 β na secreção láctea

As coletas de leite das glândulas AE e AD, para extração da fração láctea para pesquisa da citocina, foram realizadas em dois dias pré-inoculação (D2 e D3) e em quatro pós-inoculação (D4, D5, D6 e D7). A fração foi obtida através da centrifugação de 10 mL da amostra de leite a 4.000 rpm (4°C/30 min) e remoção da camada de gordura. O leite desnatado foi transferido para tubetes que foram centrifugados por 40 min (4°C) a 13.000 rpm. As frações transparentes foram coletadas e estocadas a -80°C até o momento das dosagens.

A pesquisa foi realizada utilizando-se kit comercial de ELISA (Bovine IL-1 β – Pierce Biotechnology, Rockford, USA), conforme metodologia indicada pelo fabricante. O kit comercial utilizado era específico para detecção de citocina em bovinos, porém, Mingala et

al., (2007) descreveram homologia na sequência de aminoácidos da IL-1 β , entre *Bubalus bubalus*, espécie de búfalo utilizado no experimento, e bovinos, de 98,6%.

A metodologia indicada pelo fabricante do kit foi a seguinte: Os anticorpos de captura foram diluídos 1:100 em tampão bicarbonato e adsorvidos em placas contendo 96 poços de fundo plano. As placas foram mantidas em temperatura ambiente *overnight*. As placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS) contendo Tween 20, bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS e albumina de soro bovino - BSA) e incubadas por 1h à temperatura ambiente. Após lavagem das placas a curva padrão foi montada utilizando-se diluição seriada 1:2, partindo-se da concentração mais elevada que foi 2.000 pg/mL. As amostras foram homogeneizadas e adicionadas aos poços. As análises foram feitas em duplicada para cada amostra da fração láctea. As placas foram mantidas por 1h à temperatura ambiente e subsequentemente lavadas. Anticorpos de detecção foram diluídos e acrescentados a cada poço, as placas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente. Após lavagem das placas foi acrescentado a cada poço streptavidina conjugada com peroxidase. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a lavagem das placas e acrescentou-se a solução de substrato (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine) com incubação das placas, à temperatura ambiente, por aproximadamente 15 a 30 minutos, novamente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição, em cada poço, de solução de ácido sulfúrico, 0,16M. A leitura foi realizada em espectrômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. A concentração das citocinas, presente em cada amostra, foi determinada utilizando a curva padrão que variou de 2.000 pg/mL a 31,250 pg/mL.

4.7 Análise estatística

Foi realizada uma Análise de Variância para determinar a diferença entre as duas espécies nos parâmetros estudados. Para analisar o comportamento das concentrações de IL-1 β no leite, ao longo do período experimental realizou-se um ajuste não linear, sendo:

$$Y_i = a + b^x + \varepsilon$$

Onde:

Y = a variável resposta estudada;

x = o dia do experimento em que foi feita a mensuração;

ε = erro aleatório.

Finalmente, para analisar o grau de associação entre as variáveis estudadas foi realizada uma análise de Correlação de Pearson. Foi utilizado o *Software STATISTICA* versão 8.0 (StatSoft, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mensuração dos níveis de IL-1 β no leite da glândula AE no D3 (dia da inoculação), revelou nas búfalas a concentração média de 0,002 ng/mL e nas vacas, 0,006 ng/mL. Nesse e nos dois dias que antecederam a inoculação, as glândulas mamárias estavam livres de infecção e a CCS da glândula AE encontrava-se dentro dos parâmetros considerados fisiológicos, 18.000 nas vacas e 26.000 nas búfalas. A inoculação de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) induziu elevação nos níveis de IL-1 β nas duas espécies animais. Foi observada uma grande variação entre os indivíduos (elevado desvio padrão) e diferença ($p < 0,05$) entre as duas espécies relativa ao comportamento da concentração de IL-1 β /mL de leite da glândula AE, ao longo do período de avaliação. A cultura bacteriológica do leite revelou que 100% das vacas e das búfalas, nos três dias posteriores à inoculação (D4, D5 e D6), apresentavam na glândula AE a bactéria inoculada e a contagem de *S. aureus* evidenciou que não houve diferença estatística entre o Log10 de UFC/mL de leite de vacas e de búfalas ($p > 0,05$), ao longo do período experimental.

Nas 24h pós-inoculação (D4) as búfalas apresentaram uma concentração média de 0,372 ng/mL e alcançaram o pico no D5, com 0,413 ng de IL-1 β por mililitro de leite. Houve uma queda brusca nas 72h pós-inoculação (D6) e no último dia da mensuração encontrava-se com uma concentração média de 0,164 ng/mL de leite (D7). Ao contrário das búfalas, as vacas apresentaram um aumento médio menos expressivo nas 24h pós-inoculação (0,088 ng/mL) e alcançou o seu pico nas 72h pós-inoculação (D6) (1,061 ng/mL). As médias anteriormente citadas podem ser observadas na Figura 1 e os desvios padrões e os valores máximos e mínimos verificados em cada dia de aferição podem ser visualizados na Tabela 2.

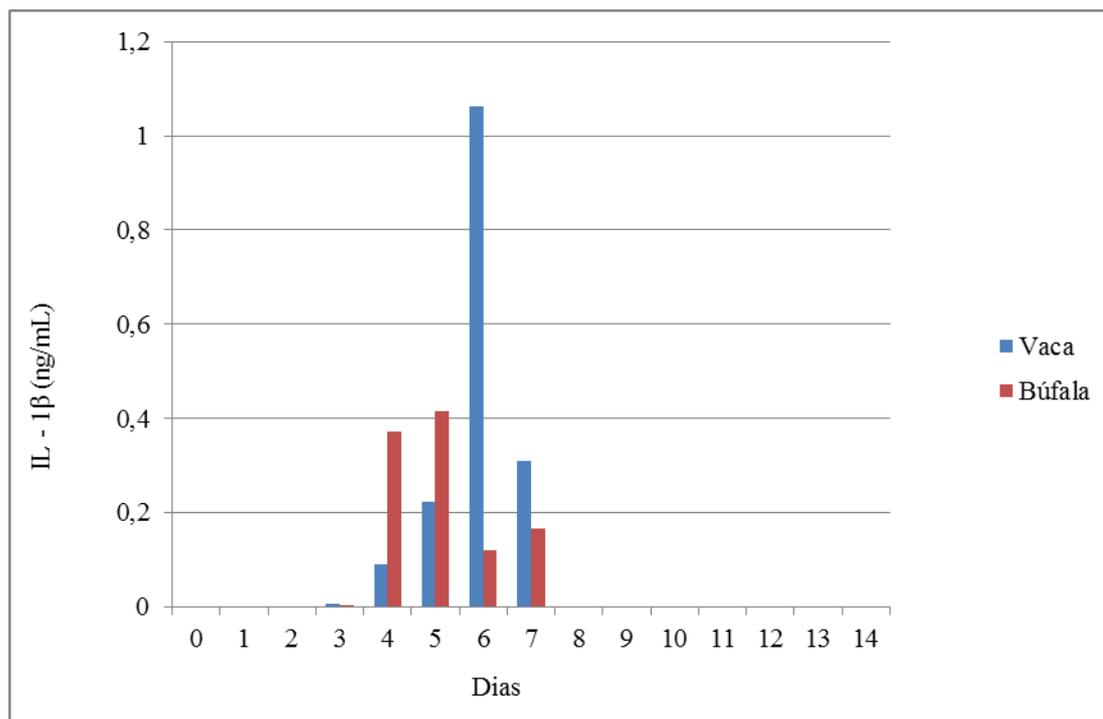


Figura 1 - Efeito da inoculação de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na concentração (média) de IL-1 β no leite da glândula AE de vacas e búfalas.

Tabela 2 - Concentrações médias, mínimas e máximas de IL-1 β no leite da glândula AE e desvios padrões* pré (D3) e pós-inoculação (D4, D5, D6 e D7) de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) em vacas e búfalas

Dias	Vacas			Búfalas		
	Mínimo	Média	Máxima	Mínimo	Média	Máxima
D3	0,003	0,006 (0,002)*	0,011	0,000	0,002 (0,001)	0,006
D4	0,019	0,088 (0,042)	0,146	0,020	0,372 (0,372)	1,056
D5	0,013	0,223 (0,252)	0,836	0,085	0,413 (0,396)	1,533
D6	0,039	1,061 (1,359)	3,72	0,007	0,120 (0,092)	0,284
D7	0,031	0,310 (0,429)	1,631	0,014	0,164 (0,152)	0,521

Apesar da glândula AD manter-se livre de infecção bacteriana ao longo do experimento, houve elevação da IL-1 β , sendo que o pico nas búfalas foi de 0,031 ng/mL (D5) e nas vacas de 0,037 ng/mL (D6), mesmos momentos de pico da IL-1 β da glândula inoculada com *S. aureus*. Segundo Roitt & Delves (2004), as citocinas produzidas localmente apresentam a capacidade de alcançar a corrente sanguínea e outros tecidos, o que poderia explicar sua elevação nas glândulas controle. Outra justificativa para esta elevação é o fato de que as glândulas controle sofreram o processo de inoculação o que pode ter provocado

alguma injúria e, segundo Watson, Oliver & Khaled (2011), citocinas apresentam, como uma de suas funções, o reparo tecidual.

Alguns experimentos e estudos observacionais foram realizados no intuito de mensurar a IL-1 β no leite bovino, porém, não foram encontradas referências desta mensuração em leite bubalino, pós-indução de mastite. Bannerman et al. (2004), inocularam 74 UFC de *S. aureus* na glândula mamária de vacas da raça Holandesa e induziram aumento nos níveis de IL-1 β . O comportamento verificado foi diferente ao encontrado no presente experimento, tanto em relação à concentração máxima de citocina encontrada como ao momento do pico e duração dos níveis elevados. A elevação iniciou 16h pós-inoculação, alcançou o pico nas 32h (0,22 ng/mL) e caiu à níveis pré-inoculação nas 48h pós-inoculação. Os pesquisadores também verificaram aumento da citocina nas glândulas controles, 0,05 ng/mL no momento de pico. Simojoki et al. (2011) induziram mastite em vacas utilizando inóculo com 5.000.000 de UFC. Duas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas foram utilizadas (*S. simulans* e *S. epidermidis*). As duas espécies induziram elevação da IL-1 β nas glândulas inoculadas. O aumento iniciou nas 6h pós-inoculação e alcançou o pico (0,61 ng/mL e 0,39 ng/mL) nas 12h. Os dois trabalhos anteriormente referenciados utilizaram ELISA para detecção da citocina e relataram, da mesma forma que o experimento em questão, grandes desvios padrões. Nessa pesquisa, a concentração máxima de IL-1 β detectada no leite da glândula AE bovina foi de 1,061 ng/mL, valor superior ao relatado por Bannerman et al. (2004) e Simojoki et al. (2011). A diferença entre os resultados deste estudo e os de Bannerman et al. (2004) poderia ser explicada pelo maior volume de bactérias infundidas na glândula (1000 UFC x 74 UFC) e entre os resultados de Simojoki et al. (2011), pelas espécies inoculadas pelos pesquisadores, ambas coagulase negativas, portanto menos virulentas. Outro aspecto que poderia influenciar nesta diferença é o fato do *S. aureus* (SBP 09/10) ser produtor da enterotoxina estafilocócica tipo D (SED), superantígeno capaz de induzir uma forte resposta por citocinas pró-inflamatórias, que segundo Leeuwen et al. (2005) e Contreras & Rodrigues (2011), normalmente está relacionado com casos de mastite gangrenosa.

A avaliação da CCS, nas duas espécies, permite afirmar que houve elevação significativa ($p < 0,05$) pós-inoculação, já nas 24h (D4), sendo que nas búfalas, o aumento foi mais expressivo ($p < 0,001$). A Figura 2 mostra a mediana da CCS ao longo do período experimental.

Ao analisar a relação entre concentração de IL- 1 β (ng/mL) e CCS/mL de leite, observa-se que houve diferença entre as duas espécies ($p < 0,05$). Nas vacas o coeficiente de correlação entre a CCS e IL-1 β foi de 0,65 ($p < 0,05$) enquanto que nas búfalas não se observou

uma correlação ($p > 0,05$). Esta diferença entre as búfalas e as vacas pode ser visualizada, observando-se a relação existente em D6. Neste dia as CCS das duas espécies foram iguais ($p > 0,05$), contudo as concentrações de IL-1 β foram diferentes ($p < 0,05$), vacas com média de 1,061 ng/mL e búfalas com média de 0,120 ng/mL.

A correlação entre IL-1 β e CCS/mL de leite, detectada na espécie bovina, corrobora com a afirmação de Alluwaimi (2004) e Sakemi, Tamura & Hagiwara (2011), de que a pesquisa e mensuração de citocinas poderiam contribuir no diagnóstico da mastite.

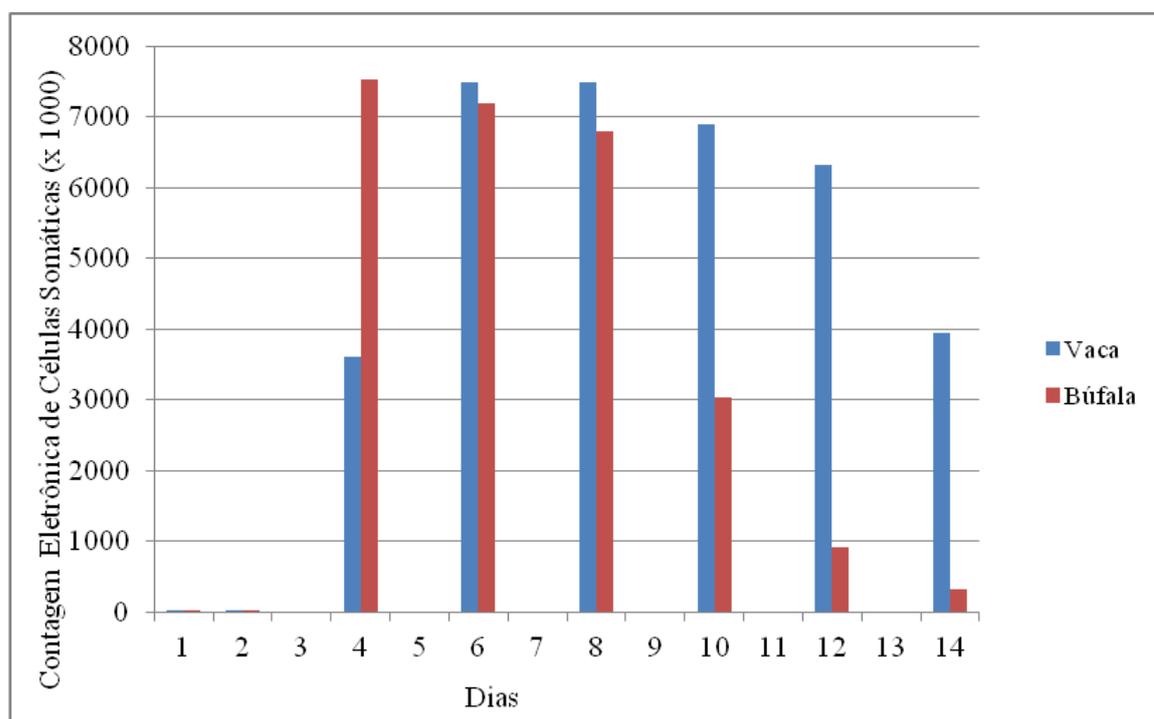


Figura 2 - Efeito da inoculação de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na CCS/mL de leite (mediana) da glândula AE de vacas e búfalas.

A análise dos resultados do presente experimento permite sugerir que as búfalas responderam mais rapidamente aos danos teciduais e aos fatores de virulência do patógeno, que segundo Carlton & McGavin (1998), seriam os fatores necessários para que os macrófagos produzissem e liberassem IL-1 β . A comparação entre as concentrações máximas de IL-1 β /mL e de CCS/mL detectadas nas duas espécies animais também sugere que as búfalas, com menor concentração de IL-1 β , foram capazes de apresentar contagens semelhantes de CS à das vacas (Figuras 1 e 2). A concentração verificada no pico de IL-1 β no leite das vacas foi 1,57 vezes maior que a concentração verificada no pico de IL-1 β no leite das búfalas.

A aparência e consistência da glândula inoculada, aspecto da secreção láctea e CCS foram os parâmetros utilizados para calcular o escore da resposta localizada à

inflamação. Foi observada uma correlação ($p < 0,05$) entre a concentração de IL-1 β no leite das vacas e o escore da resposta localizada, $r = 0,96$ (Figuras 1 e 3). Wenz et al. (2010) realizaram estudo observacional em 197 vacas com mastite clínica. Semelhante ao presente trabalho, os pesquisadores encontraram relação entre concentração de IL-1 β /mL de leite e severidade da mastite. Ao longo do período experimental, duas vacas apresentaram ulceração da glândula inoculada, que apresentou secreção serosanguinolenta, evoluindo para purulenta. Analisando o comportamento desses dois animais em relação à CCS e concentração de IL-1 β /mL de leite não foi observada diferença em relação ao comportamento dos demais animais. O planejamento do experimento não permitiu que os animais fossem acompanhados por um longo período de tempo. Talvez isso fosse necessário para verificar se as demais vacas não evoluiriam para o processo de ulceração.

A correlação entre escore da resposta localizada à inflamação e concentração de IL-1 β /mL de leite não foi observada nas búfalas. Este resultado deve-se, principalmente ao fato, de que no D6 a concentração de IL-1 β no leite das búfalas foi baixa mesmo apresentando um escore elevado (Figuras 1 e 3).

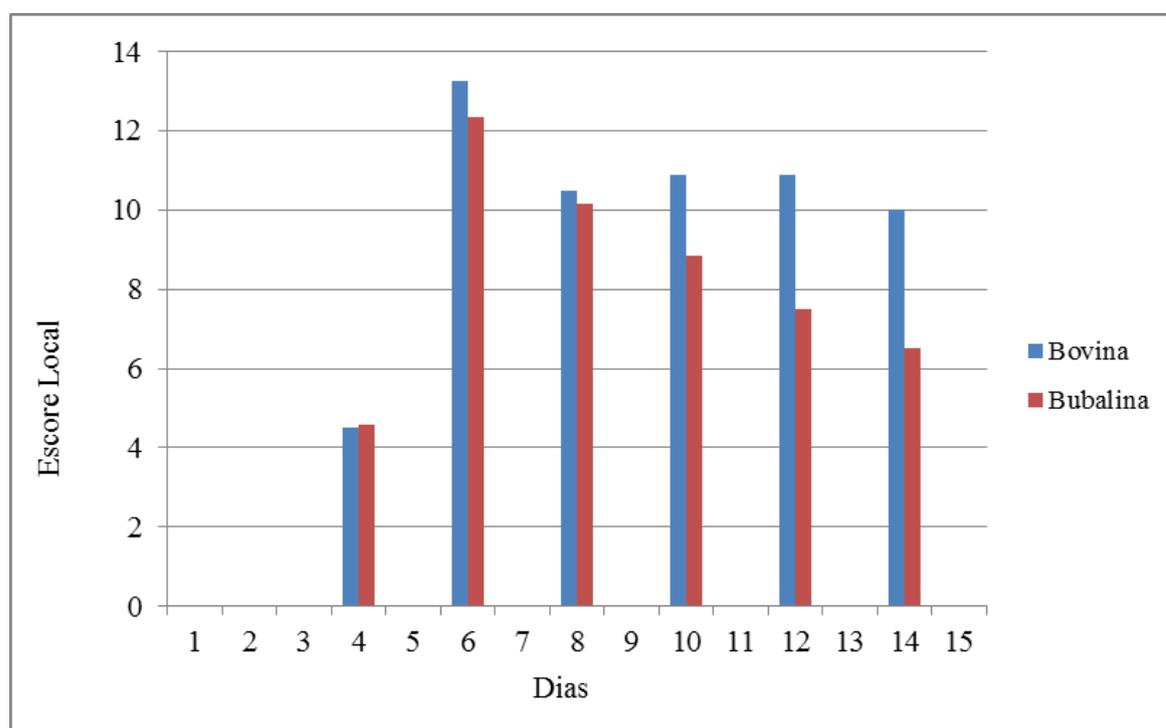


Figura 3 - Média do escore local, bovino e bubalino, pós-inoculação intramamária de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE, nos diferentes dias do experimento.

Um dos efeitos sistêmicos desencadeados pela IL-1 β é a febre (Abbas & Lichtman, 2007). Observando a evolução da concentração da IL-1 β (Figura 1) e a evolução da

temperatura retal nos bovinos e bubalinos (Figura 4) percebe-se que o pico dos dois parâmetros foram idênticos nas vacas (D6), mas não nas búfalas (D5 para IL-1 β e D6 para temperatura retal). A análise estatística revelou uma correlação ($p < 0,05$) de 0,81 para as vacas. Essa correlação não foi observada nas búfalas.

Bannerman et al. (2004), em vacas, relataram que a elevação da IL-1 β no leite teve correlação com o início da resposta febril e que, semelhante ao presente experimento, o momento de pico dos dois parâmetros ocorreu no mesmo período.

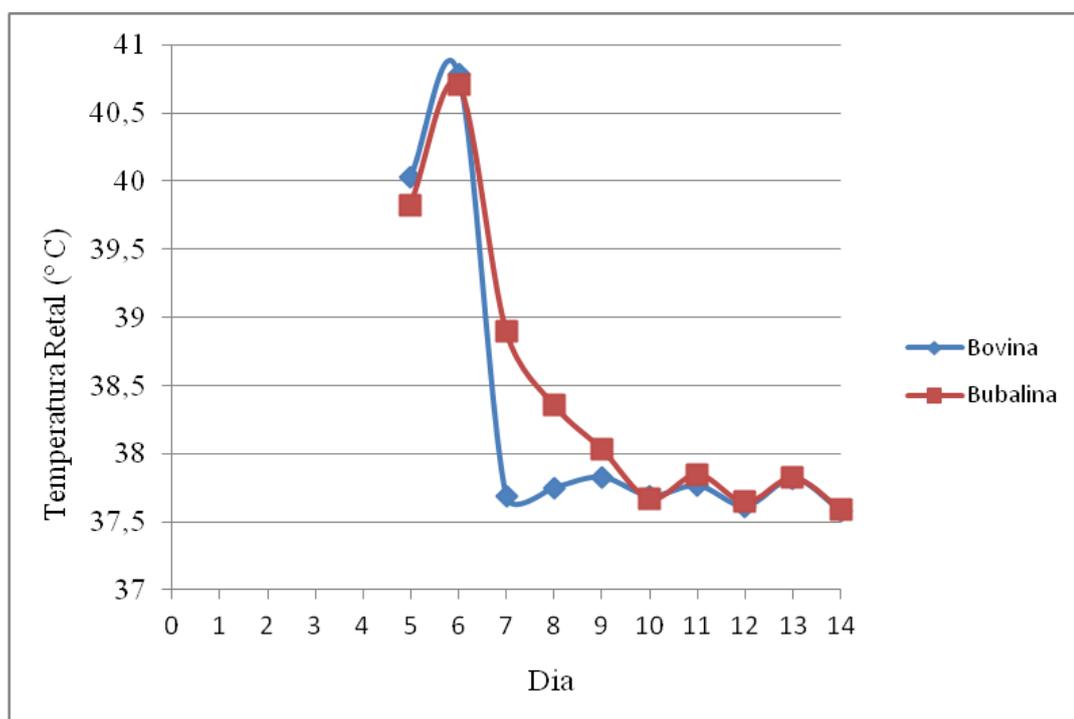


Figura 4 - Média da temperatura retal, bovina e bubalina, pós-inoculação intramamária de 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) na teta AE, nos diferentes dias do experimento.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento, pôde-se concluir que a inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* (SBP 09/10) é capaz de induzir elevação na concentração de IL-1 β no leite das espécies bovina e bubalina. Há diferença na fisiopatologia da mastite entre as duas espécies, demonstrada pelo comportamento da concentração de IL- 1 β . As búfalas apresentam uma elevação mais rápida, porém as vacas alcançam uma concentração mais elevada desta citocina. Na espécie bovina há correlação entre a concentração da IL-1 β no leite, CCS, escore da resposta localizada à inflamação e temperatura retal. A espécie bubalina alcança contagem máxima de células somáticas à semelhança da espécie bovina, mas com menor concentração de IL- 1 β /mL de leite.

7 AGRADECIMENTOS

À UPIS, por disponibilizar as búfalas e o local para o desenvolvimento do experimento; ao Laboratório de Bacteriologia do Depto de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo isolamento e doação da bactéria inoculada; ao Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela realização da CCS e ao Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) pelo auxílio nas dosagens de citocinas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ALLUWAIMI, A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, n. 77, p. 211-222, 2004.

ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1-6, 2005.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.

AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 111-117, 2005.

ARAUJO, D.K.G; GHELLER, V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

ATALLA, H.; GYLES, C.; WILKIE, B.; MALLARD, B. et al. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. **Veterinary Microbiology**, n.137, p. 326-334, 2009.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.

BHATIA, K.L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo Milk. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 162-164, 1994.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2 ed., Porto Alegre: ArtMed, 1998. 672p.

CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUES, J.M. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, n. 16, p. 339 – 356, 2011.

FRANCISCIS, G.; DIPALO, R. Buffalo Milk production. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo: 1994. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], v. 1, p. 137-145, 1994.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, n. 1, p. 26-27, 2000.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell, 2010. 643p.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 249-259, 1988.

KARLSSON, A.; ARVIDSON, S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. **Infection Immunology**, n. 70, p. 4239-4246, 2002.

KIM, K.W.; IM, J.; JEON, J.H. et al. *Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NK- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 2011.

KUMAR, R.; BATHIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1994, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 2009-2220, 1994.

LEEUWEN, W.B.V.; MELLES, D.C.; ALAIDAN, A. et al. Host- and Tissue-Specific Pathogenic Traits of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4584 - 4591, 2005.

LI, J.P.; ZHOU, H.J.; YUAN, L. et al. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 10, p. 753-760, 2009.

LINDE, A.; ROSS, C.R.; DAVIS, E.G. et al. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 247-265, 2008.

MARTINS FILHO, L.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CESCO, F.T.R.S. et al. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **ARS Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2007.

MINGALA, C.N.; ODBILEG, R.; KONNAI, S. et al. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of swamp type buffalo contrasting with other

bubaline breeds. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n. 30, p. 119-131, 2007.

OTE, I.; TAMINIAU, B.; DUPREZ, J.N. et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, n. 153, p. 285-292, 2011.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PRIYADARSHINI, S.; KANSAL, V.K. Lysozyme activity in buffalo milk: Effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 6, p. 895-899, 2002.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Europa: Wolf, 1994. 648p.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

RAINARD, P.; FROMAGEAU, A.; CUNHA, P.; GILBERT, F.B. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 1-13, 2008.

REED, S.B.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E. et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. **Infection Immunology**, n. 69, p. 1521-1527, 2001.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos da Imunologia**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004. 489p.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 320-326, 2004.

SAHOO, G.; MORE, T.; SINGH, V.K. A comparative study on certain enzymes of the granulocyte from different ruminant species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 319-325, 2006.

SAKEMI, Y.; TAMURA, Y.; HAGIWARA, K. Interleukin-6 in quarter Milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Research**, n. 78, p. 118-121, 2011.

SEYKORA, A.J.; McDANIEL, B.T. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: A review. **Journal of Dairy Science**, n. 68, p. 2087-2093, 1985.

- SIMOJOKI, H.; SALOMÄKI, T.; TAPONEN, S. et al. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. **Veterinary Research**, v. 42, n. 49, p. 1-10, 2011.
- SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.
- STATSOFT, INC. **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0, 2007. www.statsoft.com.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – uma introdução**, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.
- VAZ, A.K. Imunidade da glândula mamária. **Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite em Revista**, v.1, n. 5, p. 16-19, 2004.
- WATSON, C.J.; OLIVER, C.H.; KHALED, W.T. Cytokine signaling in mammary gland development. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, p. 124-129, 2011.
- WENS, J.R.; FOX, L.K.; MULLER, F.J. et al. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2458-2470, 2010.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este experimento teve o objetivo de verificar semelhanças e diferenças na resposta imune inata, no aspecto clínico e de diagnóstico e nas alterações de composição e produção de leite bubalino e bovino em mastite induzida por inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (SBP 09/10).

O inóculo utilizado foi capaz de instituir resposta inflamatória nas duas espécies animais. Pôde-se observar um comportamento diferenciado na cinética de células somáticas, visto que a elevação foi mais precoce nas búfalas e persistiu por menor tempo nesta espécie.

As glândulas mamárias da espécie bubalina alcançaram mais rapidamente um *status* sanitário satisfatório pós-exposição ao *S. aureus*, verificado pela análise do leite da ordenha completa das duas espécies. O leite das vacas manteve-se com contagens elevadas de células somáticas até o final do experimento, enquanto que o das búfalas retornou aos parâmetros fisiológicos.

Nas duas espécies, houve redução de produção e diminuição dos teores de lactose e extrato seco desengordurado, que apresentaram correlação com a CCS.

A avaliação clínica demonstrou que os animais desenvolveram mastite clínica superaguda, com maior persistência da bactéria na glândula mamária bovina e maior velocidade de recuperação dos parâmetros de avaliação da resposta localizada à inflamação e da resposta sistêmica à inflamação, na espécie bubalina. Estes resultados permitem concluir que existem diferenças na fisiopatologia da mastite entre as duas espécies e que as búfalas demonstram maior eficiência no combate ao agente infeccioso.

Os testes de CMT e CCS, rotineiramente utilizados para avaliar a sanidade da glândula mamária, apresentaram correlação entre si e com a cultura bacteriana, nas duas

espécies. Este resultado confirma a viabilidade dos testes utilizados rotineiramente para vacas na detecção da mastite bubalina.

A IL- 1 β , citocina pró-inflamatória responsável por importantes eventos no tecido glandular mamário, teve sua concentração aumentada a partir da inoculação bacteriana, nas duas espécies. O comportamento da concentração de IL- 1 β foi diferente nas espécies bovina e bubalina. As búfalas responderam mais rapidamente ao patógeno, porém com menor intensidade e persistência, quando comparadas às vacas.

Na espécie bovina há correlação entre a concentração da IL-1 β no leite, CCS, escore da resposta localizada à inflamação e temperatura retal. Esta correlação não é observada nas búfalas.

A espécie bubalina alcança contagem máxima semelhante de células somáticas à espécie bovina, com uma menor concentração média de IL- 1 β /mL de leite.