

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS**

**PERFIL BIOQUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E
CELULAR DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO
PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO**

PRICILLA POZZATTI

**BELO HORIZONTE
UFMG
2014**

PRICILLA POZZATTI

**PERFIL BIOQUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E CELULAR DO
LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE
LACTAÇÃO**

**Dissertação apresentada à UFMG, como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciência animal.**

**Área de concentração: Medicina e
Cirurgia Veterinárias.**

**Orientador: Fabiola de Oliveira Paes
Leme**

**BELO HORIZONTE
UFMG
2014**

P893p Pozzatti, Pricilla Nascimento, 1983-
Perfil bioquímico, microbiológico e celular do leite de vacas girolandas do parto aos 180 dias de lactação / Pricilla Nascimento Pozzatti. – 2014.

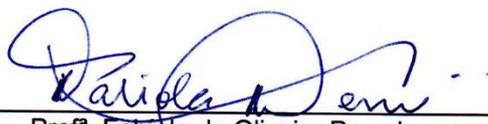
87 p. : il.

Orientador: Fabíola de Oliveira Paes Leme
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Bacteriologia – Teses. 3. Leite – Composição – Teses. I. Leme, Fabíola de Oliveira Paes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada em 13 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof^a. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Presidente - Orientador



Prof. Luciano dos Santos Bersot
Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina



Prof. Elias Jorge Facury Filho
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico esta dissertação ao meu marido-amigo Fernando Passon Casagrande, aos amigos feitos durante as várias ordenhas das madrugadas deste experimento e sem dúvida ao Lilito, à Remela e ao Bezerro, que alegraram e alegam minha vida a cada vez em que entro pela porta de casa...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por permitir mais esta conquista!!! Agradeço ao marido de aço Fernando Passon Casagrande: Por que me aturar durante todo o experimento e escrita não foi fácil, principalmente os dois trabalhando juntos na mesma fazenda... Agradeço à minha orientadora Fabiola de Oliveira Paes Leme: Sem ela, não teria mestrado!!! Meu agradecimento vai também para os donos da fazenda onde o projeto foi executado. Aos amigos que deixamos no distrito e que muito nos ajudaram: Otávio Júnior, Neuza, Leninha, Bruno, Igor e outros funcionários da fazenda que tanto nos ajudaram e incentivaram a não desistir. Em especial à Mara, Sâmilla e Pâmela: vocês alegraram nossa estada no distrito. Aos amigos da UFMG da Patologia Clínica e em especial, a Clínica de Ruminantes: Obrigada pelo acolhimento e conselhos!!! Por último e não menos importante, às vacas, pois sem elas também não existiria experimento...

“Você está parado em uma encruzilhada, olhando a montanha que tem que escalar. Bem lá no alto, fica o seu sonho e você está pensando, como vou conseguir?”

*Alguns já falaram: você ficou louco! Sabem quantos tentaram? Você nunca vai chegar!
Mas estas pessoas ficarão ofuscadas quando a luz da sua estrela começar a brilhar.*

Então vá seguindo, não olhe para trás, persiga seu sonho e chegue até lá. E se falarem, tudo bem, não importa, por que, para Deus, você é uma flor.”

Iveline.

SUMÁRIO

	RESUMO	16
1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	MASTITE.....	20
2.1.1	Glândula Mamária	20
2.1.1.2	Anatomia e Fisiologia da Glândula Mamária.....	20
2.1.2	Definição e Classificação da Mastite	20
2.1.3	Etiologia e Transmissão da Mastite	21
2.1.4	Diagnóstico da Mastite	22
2.1.5	Tratamento da Mastite	22
2.1.6	Prevenção e Controle da Mastite	23
2.2	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS).....	23
2.2.1	Efeitos do Estágio de Lactação na Alteração da Contagem de Células Somáticas (CCS)	24
2.2.2	Definição de Mastite Através da Contagem de Células Somáticas (CCS)	24
2.3	QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	24
2.4	MASTITE E ISOLAMENTO BACTERIANO.....	25
2.4.1	Patógenos Causadores de Mastite	25
2.4.1.1	Patógenos Contagiosos.....	25
2.4.1.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.4.1.2	Patógenos Ambientais.....	26
2.4.1.2.1	<i>Streptococcus sp.</i>	26
2.4.1.2.2	<i>Streptococcus uberis</i>	26
2.4.1.2.3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	26
2.4.1.2.4	Coliformes Causadores de Mastite	26
2.4.1.2.4.1	<i>Escherichia coli</i>	26
2.4.1.2.4.2	<i>Proteus sp.</i> e <i>Enterobacter</i>	27
2.4.1.2.5	<i>Pseudomonas sp.</i>	27
2.4.1.2.6	<i>Bacillus sp.</i>	27
2.4.1.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	27
2.5	PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE.....	28
2.5.1	Prevalência de Patógenos em Alguns Países do Mundo	28
2.5.2	Prevalência de Patógenos em Alguns Estados do Brasil	28
2.6	MINERAIS.....	29
2.6.1	Cálcio	29
2.6.2	Fósforo	30
2.6.3	Magnésio	30
2.6.4	Cloreto	31
2.7	ENZIMAS.....	31
2.7.1	Fosfatase Alcalina	31
2.7.2	Gama-Glutamil Transferase	32
2.8	CÉLULAS.....	32
2.8.1	Neutrófilos	32
2.8.2	Linfócitos	34
2.8.3	Macrófagos	35
2.8.4	Eosinófilos, Células Epiteliais e Basófilos	36
3	OBJETIVOS GERAIS	37
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	HIPÓTESE	37
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37

Capítulo I	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA E ISOLAMENTO BACTERIANO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO.....	40
1	INTRODUÇÃO.....	40
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)	41
3.2	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) EM MASTITE SUBCLÍNICA.....	43
3.3	QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	45
3.4	CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	46
3.5	ISOLAMENTO DE PATÓGENOS.....	46
4	CONCLUSÕES.....	50
Capítulo II	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO.....	52
1	INTRODUÇÃO.....	52
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1	CÁLCIO.....	52
3.2	FÓSFORO.....	54
3.3	MAGNÉSIO.....	55
3.4	CLORETOS.....	57
3.5	FOSFATASE ALCALINA.....	58
3.6	GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE.....	59
3.7	CORRELAÇÕES.....	61
4	CONCLUSÕES.....	62
Capítulo III	CONTAGEM DIFERENCIAL CELULAR DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO.....	63
1	INTRODUÇÃO.....	63
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1	CORRELAÇÕES.....	73
4	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE TABELAS

Capítulo I	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA E ISOLAMENTO BACTERIANO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Tabela 1 -	Médias dos valores de Contagem de Células Somáticas (CCS) do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	42
Tabela 2 -	Frequência (%) de Contagem de Células Somáticas inferiores e superiores à 200.000/ml de leite do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	44
Tabela 3 -	Frequência (%) por escore da Quantificação Bacteriana do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, sendo (+) para vacas com pouca carga bacteriana e (+++++) para vacas com alta carga bacteriana.....	45
Tabela 4 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	47
Tabela 5 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	47
Tabela 6 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Streptococcus</i> spp., <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	48
Tabela 7 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Streptococcus</i> spp., <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp. aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	48
Tabela 8 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp. e <i>Enterobacter</i> no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	49
Tabela 9 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp. e <i>Enterobacter</i> aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas	

	pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	49
Tabela 10 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus haemolyticus</i> no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	50
Tabela 11 -	Frequência, seguida da prevalência de <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus haemolyticus</i> aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	50
Capítulo II	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Tabela 1 -	Médias da concentração de cálcio (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas mestiças girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	53
Tabela 2 -	Médias da concentração de fósforo (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	54
Tabela 3 -	Médias da concentração de magnésio (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	56
Tabela 4 -	Médias da concentração de cloreto (mEq/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	57
Tabela 5 -	Médias da concentração de fosfatase alcalina (U/L) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação provenientes de fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	59
Tabela 6 -	Médias da concentração de gama-glutamil transferase (U/L) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	60
Capítulo III	CONTAGEM DIFERENCIAL CELULAR DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Tabela 1 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de neutrófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	64

Tabela 2 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de linfócitos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	66
Tabela 3 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de macrófagos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	67
Tabela 4 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de eosinófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	69
Tabela 5 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de células epiteliais no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	70
Tabela 6 -	Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de basófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo I	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA E ISOLAMENTO BACTERIANO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Gráfico 1 -	Valores médios de Contagem de Células Somáticas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de Tukey ($p < 0,05$).....	42
Gráfico 2 -	Gráfico da regressão da Contagem de Células Somáticas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia expressa pela fórmula $\text{Log CCS} = 5,820071 - 0,00923 t + 0,000045 t^2$. $P < 0,0000$ e $r^2 = 55,32\%$	43
Gráfico 3 -	Frequência (%) da Contagem de Células Somáticas inferiores e superiores à 200.000/ml de leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	44
Gráfico 4 -	Distribuição de frequência do escore de Quantificação Bacteriana do leite de 25 vacas girolandas pluríparas no parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia.....	46
Capítulo II	AValiação Bioquímica do Soro do Leite de Vacas Girolandas do Parto aos 180 dias de Lactação	
Gráfico 1 -	Gráfico da regressão da concentração de cálcio no soro do leite ($n=25$) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $43,76927 - 0,452641 d + 0,004965 d^2 - 0,000016 d^3$ $P < 0,0014$ e $R^2 = 58,73\%$	53
Gráfico 2 -	Gráfico da regressão da concentração de fósforo no soro do leite ($n=25$) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma de fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $28,934608 + 0,044138 d$. $P < 0,05$ e $R^2 = 36,83\%$	55
Gráfico 3 -	Gráfico da regressão da concentração de magnésio no soro do leite ($n= 25$) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $17,231963 - 0,386873 d + 0,004482 d^2 - 0,000014 d^3$ com $P < 0,05$ e $R^2 = 35,68\%$	56

Gráfico 4 -	Gráfico da regressão da concentração de cloreto no soro do leite (n= 25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $51,474532 - 0,354726 d + 0,003441 d^2 - 0,000011 d^3$ $P < 0,0183$ $R^2 = 72,43\%$	58
Gráfico 5 -	Gráfico da regressão da concentração de Fosfatase Alcalina no soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $2781,34225 - 88,827609 d + 0,896376 d^2 - 0,002623 d^3$ $P < 0,0000$ $R^2 = 93,56\%$	59
Gráfico 6 -	Gráfico da regressão da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $18.707,4146 - 758,288153 d + 8,690169 d^2 - 0,027695 d^3$ $P < 0,0000$ $R^2 = 42,78\%$	61
Capítulo III	CONTAGEM DIFERENCIAL CELULAR DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Gráfico 1 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de neutrófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	65
Gráfico 2 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de linfócitos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	66
Gráfico 3 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de macrófagos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	68
Gráfico 4 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de eosinófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	69
Gráfico 5 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de células epiteliais no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos	

	sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	71
Gráfico 6 -	Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de basófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$).....	72

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA E ISOLAMENTO BACTERIANO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO	
Figura 1 -	Ilustração dos 10 campos ópticos utilizados para realização da Contagem de Células somáticas e Quantificação Bacteriana.....	40

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a incidência de patógenos, Contagem de Células Somáticas, Contagem Bacteriana Total, avaliação bioquímica e diferencial celular de 225 amostras de leite no período de fevereiro de 2012 a novembro de 2012. Foram utilizadas 25 vacas mestiças, pluríparas, provenientes de uma fazenda comercial localizada no distrito de Ibitira, município de Martinho Campos, Minas Gerais. Para a coleta, foi realizado o *pré-dipping* feito rotineiramente pela fazenda, em seguida, a limpeza dos tetos com uma gaze embebida em álcool 70%. Após este procedimento foi realizado o descarte dos três primeiros jatos de leite e realizado o armazenamento. As coletas foram realizadas no dia exato do parto sendo o colostro, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias subsequentes. Após coleta do leite, as lâminas foram confeccionadas e coradas para Contagem Bacteriana Total, estimativa de Contagem de Células Somáticas e diferencial celular. O restante do material foi utilizado para isolamento bacteriano e avaliação bioquímica. Na Contagem de Células Somáticas, foi observado diminuição entre o terceiro e quarto meses de lactação e aumento para o terço-médio da lactação. Cerca de 48% das vacas avaliadas em todos os tempos apresentaram CCS acima de 200.000 células/ml de leite. Quanto à presença de patógenos, das 25 vacas, 18 (72%) foram positivas para o *Staphylococcus aureus* no início da lactação e somente esse patógeno se mostrou presente até o fim do experimento. Os patógenos mais prevalentes no decorrer desse estudo foram o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Bacillus* spp. Na avaliação bioquímica realizada em aparelho automático, quando ocorreu aumento da concentração de células somáticas, houve aumento na concentração de cloreto, cálcio, magnésio, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase no leite. No diferencial celular realizado por microscopia óptica, quando houve aumento da concentração de células somáticas, ocorreu aumento da concentração de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos, células epiteliais e basófilos.

PALAVRAS-CHAVE: *mastite; bactérias; celularidade; bovinos; leite.*

ABSTRACT

This study evaluated the incidence of pathogens, such as Somatic Cells Count, Total Bacterial Count, biochemical evaluation and differential cell of 225 milk samples from February 2012 to November 2012. Twenty five crossbred cows, pluriparous, from a commercial farm located in the district of Ibitira, Martinho Campos, Minas Gerais were used. To collect, *pre-dipping* routinely made by the farm, then cleaning the ceilings with gauze soaked in 70% alcohol was performed. After this procedure the disposal of the first three streams of milk was performed and conducted the store. The collections were made on the exact day of delivery and colostrum, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days thereafter. After milk collection, the slides were prepared and stained for Total Bacterial Count, estimated somatic cell count and differential cell count. The remaining material was used for bacterial isolation and biochemical evaluation. In somatic cell count, decreased between the third and fourth months of lactation and increased for the middle third lactation was observed. About 48% of the animals evaluated at all times had Somatic Cells Count above 200,000 cells/ml of milk. For the presence of pathogens, of 25 cows, 18 (72%) were positive for *Staphylococcus aureus* in early lactation and only this pathogen was present until the end of the experiment. The most prevalent pathogens in the course of this study were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Bacillus* spp. In biochemical evaluation in automatic device, when there was an increased concentration of somatic cells, there was an increase in the concentration of chloride, calcium, magnesium, alkaline phosphatase and gamma- glutamyl transferase in milk. The differential cell performed by optical microscopy, was increased when the concentration of somatic cells, it increased the concentration of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages, epithelial cells and basophils.

KEY-WORDS: *mastitis; bacteria; cellularity; cattle; milk.*

1 INTRODUÇÃO

Leite é uma secreção produzida por todas as fêmeas mamíferas objetivando a satisfação das necessidades básicas dos neonatos atuando também em diversas funções fisiológicas incluindo imunoglobulinas, enzimas, enzimas inibitórias, fator de crescimento, hormônios e agentes antibacterianos (Thompson et al., 2009). É sobretudo fonte de nutrientes (Rosenthal, 1991), sendo composto por minerais, hormônios, enzimas, lactose, proteínas, lipídeos e água (Thompson et al., 2009).

O leite de vaca contém aproximadamente 87,4% de água e 12,6% de sólidos gerais. Dentre os sólidos, estão inseridas as gorduras (3,9%), as proteínas (3,2%), a lactose (4,6%) e outros sólidos como as enzimas, minerais e vitaminas (0,9%) (Harding, 1995). Seus derivados são considerados produtos de forte impacto no mercado consumidor, uma vez que se trata de um item de necessidade básica para a população humana (Queiroz et al., 2013). Segundo a Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2011) o leite deve ser um líquido branco opalescente homogêneo, isento de sabores e odores estranhos precisando seguir requisitos físico-químicos, microbiológicos e de contagem de células somáticas (Brasil, 2002).

No mundo, os vinte maiores países produtores, produziram em 2011, a marca de aproximadamente 720 milhões de toneladas de leite (IFCN, 2012) com crescimento previsto para 2012 de aproximadamente 3,0% (MILKPOINT, 2012). Atualmente o Brasil ocupa o quinto lugar da produção mundial de leite de vacas e búfalas tendo produzido aproximadamente 32 milhões de toneladas no ano de 2011 perdendo apenas para a Índia, Estados Unidos da América, Paquistão e China (IFCN, 2012).

A produção leiteira é uma das mais importantes do sistema agroindustrial brasileiro movimentando cerca de US\$ 10 bilhões ao ano, gerando altos índices empregatícios e possuindo um dos maiores rebanhos do mundo (Queiroz et al., 2013). Segundo projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2012, a produção leiteira deverá crescer a uma taxa anual de 1,9% até 2022.

Do leite produzido no país, 56% é produzido por propriedades de agricultura familiar. Esse número vem aumentando e se deve aos investimentos de políticas públicas feitas aos pequenos produtores rurais (SEBRAE, 2010).

O Estado de Minas Gerais se caracteriza como o maior produtor leiteiro com uma produção no ano de 2011 de 8.756,114 litros (IBGE, 2011). A produção de leite nessa unidade federativa configura-se como uma das atividades mais importantes para a economia do Estado. (Gomes, 2005). Fatores como alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenamento do leite podem interferir na qualidade do leite in natura (Kitchen, 1981).

Em relação à qualidade do leite, a aprovação da Instrução normativa (IN) nº 51 (Brasil, 2002) e mais atualmente a substituição desta pela Instrução Normativa nº 62, que normatizam as questões relativas à obtenção, armazenamento, coleta e transporte a granel do leite cru refrigerado bem como os padrões de qualidade, vieram abordar a regulamentação de produtos derivados do leite, assim como o próprio leite cru (Brasil, 2011). Uma das causas que atuam influenciando negativamente a composição e qualidade do leite é a mastite, esta, predominantemente responsável pelo aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) (Souza et al., 2009), alterações enzimáticas (Chandan et al., 1968), alterações das características físico-químicas além de causar grandes perdas na produção (Magalhães et al., 2006).

Mastite é a inflamação do parênquima mamário (Radostitis et al., 2007) causada por micro-organismos, na maioria das vezes bactérias que se multiplicam no interior da glândula mamária produzindo toxinas (Schroeder, 2012) sendo, algumas vezes, não detectada sem testes diagnósticos complementares (Edmondson e Bramley, 2004).

A mastite pode ser classificada como mastite clínica, onde há o aparecimento de sintomas como secreções anormais, grumos no leite, desidratação, depressão da vaca e perda de apetite. Já a mastite subclínica não apresenta sinais visíveis da doença e somente é diagnosticada quando são realizados exames

complementares como a CCS e cultura bacteriana (Schroeder, 2012).

Apesar de existirem mais de 100 espécies microbianas possivelmente presentes na glândula mamária quando na presença de infecção, somente uma pequena quantidade de micro-organismos é importante para o surgimento da maioria dos casos de mastite clínica (Bier, 1984; Quinn et al., 2005), sendo os agentes mais importantes as bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma bovis* (Quinn et al., 2005; Radostits et al., 2007).

Perdas anuais devido à presença de mastite podem vir a custar mais de US\$ 200/vaca/ano e aproximadamente dois terços dessa perda ocorre devido à diminuição da produção de leite por vacas com o quadro subclínico da doença (Schroeder, 2012). No Brasil, estima-se que vacas com mastite subclínica apresentem redução de produção de leite nos quartos mamários com a doença de 25 a 42% (Brito et al., 2013). Além disso, a mastite está entre as principais causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras (Silva et al., 2004).

Visto a importância da produção mundial leiteira e a posição em que o Brasil está inserido neste contexto é de suma importância que a mastite subclínica seja diagnosticada de forma eficaz. O objetivo deste trabalho foi avaliar leite de vacas através da microbiologia, quanto à presença de patógenos causadores de mastite clínica e subclínica e sua devida identificação. Através da microscopia óptica, foi realizada a Contagem de Células Somáticas (CCS), Quantificação Bacteriana (QB) e identificação do tipo celular predominante em cada tempo de coleta, e para avaliação enzimática e mineral do leite foram realizados exames bioquímicos dos soros dos leites coletados associando-os com o período de coleta e o tempo da lactação. Os resultados e discussões desse trabalho bem como as conclusões foram divididas em capítulos para melhor visualização e compreensão dos temas abordados, o capítulo um aborda a contagem de células somáticas e à quantificação bacteriana. O capítulo dois aborda o isolamento bacteriano no decorrer da lactação. O capítulo três trata da análise bioquímica do leite quanto alguns minerais e enzimas e o capítulo quatro mostra o diferencial celular no decorrer da lactação bem como as suas correlações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE

2.1.1 Glândula Mamária

2.1.1.2 Anatomia e Fisiologia da Glândula Mamária

A lactação geralmente precede o parto em um número variável de dias e acontece através das mudanças hormonais oriundas do feto e da placenta (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). A maior parte dos constituintes do leite são provenientes do sangue que atravessam uma extensa rede de capilares (Fox, 2009) e são transportados para o interior das células epiteliais mamárias ou diretamente secretados para o lúmen alveolar (Bruckmaier, *et al.*, 1994). No retículo endoplasmático rugoso dos mamócitos, as moléculas provenientes do sangue são polimerizadas à lactose, lipídeos ou proteínas (Fox, 2009).

O úbere bovino é formado por quatro glândulas mamárias cada uma com seu próprio teto. As células que atuam na síntese do leite são conhecidas como células epiteliais mamárias (Bruckmaier, *et al.*, 1994) ou mamócitos (Fox, 2009) possuindo dois tipos de tecidos: o tecido glandular ou parenquimatoso e o tecido de sustentação ou estroma. Na vaca lactante, os alvéolos estão inseridos no parênquima dos quais o leite é secretado fluindo para as cisternas (Dyce, 1996). Os alvéolos estão dispostos em uma monocamada de formato piriforme (Fox, 2009) sendo limitados em número de 200 por um fino septo de tecido conjuntivo fibroso formando lóbulos. Esses alvéolos se abrem no ducto intralobular (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). Ao redor dos alvéolos estão presentes as células mioepiteliais que possuem forma estrelada (Dyce, 1996) sendo contráteis na presença da ocitocina e prolactina, fazendo contração das mesmas encurtando os ductos que, conseqüentemente aumentam de diâmetro, liberando o leite nos alvéolos (Dyce, 1996; Fox, 2009).

O canal do teto bovino varia de 4 a 18 milímetros de comprimento sendo a média de 12 milímetros. Possui superfície fortemente queratinizada que é fundamental para a barreira de proteção contra

bactérias, tendo o diâmetro do canal correlação positiva com a infecção. O bom funcionamento dessa estrutura contribui para a diminuição de casos de mastite (Edmondson e Bramley, 2004).

2.1.2 Definição e Classificação da Mastite

Mastite é a inflamação do parênquima glandular mamário causada, na maioria das vezes, por micro-organismos, usualmente bactérias que invadem o úbere multiplicando-se e produzindo toxinas (Wenz *et al.*, 2001; Radostitis *et al.*, 2007; Schroeder, 2012).

A classificação da mastite quanto à sintomatologia é dividida em clínica e subclínica. A forma clínica é aquela em que os sinais são visíveis, principalmente nas características físicas do leite podendo aparecer sinais específicos sistêmicos (Schroeder, 2012) e sinais específicos de inflamação nos quartos mamários afetados (Cavalcante, 2004). É muito comum no período do parto e nos primeiros três meses de lactação, possuindo uma maior incidência com o aumento do número de lactações (Edmondson e Bramley, 2004). Já mastite subclínica não apresenta alterações físicas visíveis no leite e na glândula, sendo necessários testes complementares para sua detecção. Em ambos os casos, há diminuição da produção de leite e aumento da contagem de células somáticas (Schroeder, 2012).

Quanto à forma de contaminação, a mastite é classificada como contagiosa e ambiental. Na forma contagiosa, a transmissão de patógenos ocorre durante o momento da ordenha. Neste caso, a glândula mamária infectada age como reservatório e a bactéria é transmitida de animal para animal quando a secreção láctea de uma vaca infectada entra em contato com o canal do teto de outra vaca seguindo de forma ascendente. A mastite ambiental é caracterizada pela contaminação da glândula mamária no período entre ordenhas. O reservatório bacteriano nestes casos é o ambiente em que o animal é criado. Nos casos de mastite ambiental as infecções subclínicas são menos comuns e o controle da higiene ambiental deve ser bem aplicado (Edmondson e Bramley, 2004).

2.1.3 Etiologia e Transmissão da Mastite

Os patógenos causadores de mastite podem ser classificados em patógenos contagiosos, patógenos ambientais e patógenos oportunistas (Radostitis *et al.*, 2007). Dentre os patógenos contagiosos existem aproximadamente 140 espécies e subespécies de micro-organismos que podem ser isolados da glândula mamária bovina, sendo os mais comuns o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae*. A forma de transmissão da doença ocorre predominantemente através da utilização do mesmo utensílio para secagem dos tetos do mesmo animal ou de animais diferentes, seguida por uma inadequada limpeza dos equipamentos utilizados na ordenha (Roberson *et al.*, 1994; Radostitis *et al.*, 2007). Outros agentes que são classificados como infecciosos são *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis*, sendo estes de menor importância em termos de prevalência e prejuízos à produção.

Os casos de mastite por *S. aureus* apresentam subclínicos e crônicos e desenvolvimento de quadros clínicos periódicos. Entretanto, os sinais clínicos variam de leves a casos mais graves (mastite gangrenosa). Esta bactéria possui a capacidade de se aderir e invadir as células epiteliais e o tecido intersticial da glândula mamária e é capaz de resistir à fagocitose pelos neutrófilos (Kerro Deigo *et al.*, 2002). Os mecanismos antifagocíticos incluem uma cápsula, que inibe o processo de opsonização de imunoglobulinas e a produção de leucotoxinas, que são capazes de matar células fagocíticas (Rainard *et al.*, 2003). Além disso, uma variedade de enzimas e exotoxinas lesionam o epitélio mamário resultando em fibrose e formação de microabscessos (Sutra e Poutrel, 1994). Outro fator de virulência é a produção de β -lactamase, o que reduz a efetividade de alguns antibióticos no tratamento da mastite, tais como a penicilina e a amoxicilina (Brouillette *et al.*, 2004).

Da mesma forma as infecções mamárias causadas por *S. agalactiae* resultam em quadros subclínicos com episódios periódicos de casos clínicos leves, entretanto sem afetar sistemicamente o animal (Morin, 2009). Esta bactéria se adere às células epiteliais da glândula mamária e se localiza principalmente nos ductos. A produção de leite declina com a obstrução dos

ductos por células e debris celulares e, caso a infecção se prolongue, ocorre involução dos alvéolos e permanente comprometimento da produção leiteira (Phuektes *et al.*, 2003).

A transmissão dos agentes da mastite ambiental é se dá por meio do contato do orifício do canal do teto com fezes, cama, solo ou água contaminada (Radostitis *et al.*, 2007; Morin, 2009). Como causadores da mastite ambiental estão os agentes coliformes e os estreptococos ambientais. Os principais representantes dos coliformes são a *Escherichia coli* e a *Klebsiella* spp.. Outras bactérias coliformes causadoras de mastite ambiental são as dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus* e *Pasteurella*. Os estreptococos ambientais de maior importância são *S. uberis*, *S. parauberis* e *S. dysgalactiae* (Morin, 2009).

A maior parte das infecções de glândula mamária por coliformes ocorre durante as fases iniciais e finais do período seco e os episódios clínicos ocorrem, principalmente, durante o início da lactação, como resultado da infecção adquirida durante o período seco (Bradley e Green, 2000). A grande maioria dos casos de mastite por coliformes são leves com menos de 10% dos casos resultando em doença sistêmica ou marcada diminuição da produção leiteira (Smith e Todhunter, 1985). Entretanto, infecções por agentes coliformes representam a maior parte dos casos severos de mastite clínica (Menzies *et al.*, 2003). Quando presente na glândula mamária os coliformes se multiplicam rapidamente, mas não se aderem ou invadem as células epiteliais (Burvenich *et al.*, 2003). Caso o animal esteja imunodeprimido, a multiplicação e morte bacteriana libera lipopolissacarídeos (endotoxinas) presentes na parede celular destas bactérias, que são responsáveis pelos sinais de inflamação aguda (Blum *et al.*, 2000). Bacteremia ocorre em 30 a 40% das vacas severamente acometidas por mastite por coliformes (Wenz *et al.*, 2001).

Com relação às infecções causadas por estreptococos ambientais, aproximadamente metade dos casos se iniciam durante o período seco (Todhunter *et al.*, 1995), estando a glândula mamária altamente susceptível a infecções no início e fim do período seco, como resultado do acúmulo de secreções lácteas e

comprometimento imune do animal (Green, *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria das infecções são autolimitantes em um período de 30 dias e aproximadamente 1/3 das infecções permanecem por períodos mais longos. Os quadros clínicos são leves e a produção é pouco afetada por estes agentes (Todhunter *et al.*, 1995).

Os patógenos oportunistas presentes na pele do teto ou do úbere podem causar infecção mamaria via ascendente, sendo as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos as mais comuns neste tipo de infecção (Radostitis *et al.*, 2007).

2.1.4 Diagnóstico da Mastite

O diagnóstico da mastite depende da definição da anormalidade clínica do leite (Blood e Henderson, 1978). Em quadros clínicos e agudos da doença, o leite se apresenta espesso, com pus e grumos branco-amarelados podendo aparecer sangue (Athiê, 1988; Radostitis *et al.*, 2007).

Em casos de mastite clínica, que é mais comum no início da lactação (Edmondson e Bramley, 2004), os quartos afetados pela doença se apresentam tensos, firmes, quentes, edematosos e muitas vezes o animal apresenta dor ao toque (Jubb *et al.*, 1993). Pode ocorrer ainda necrose tecidual, febre e anorexia, podendo levar ao óbito (Ladeira, 2001). Cronicamente, observa-se o endurecimento da glândula mamária e/ou atrofia dos quartos mamários acometidos (Athiê, 1988).

Em casos moderados de mastite clínica, somente a inflamação e o decréscimo da produção de leite são observados. Já em casos graves, alterações na glândula e no leite se fazem presentes podendo estar acompanhados de doença sistêmica, produzindo sintomas como letargia, depressão e taquipneia (Menzies *et al.*, 2000).

Para o diagnóstico de mastite subclínica, a Contagem de Células Somáticas (CCS) é rotineiramente realizada, podendo ser mensurada do quarto individual ou de um “pool” de todos os quartos (Sargeant *et al.*, 2001). Pode, também, ser diagnosticada por outros métodos de avaliação que incluem o California Mastitis Test (CMT) e a condutividade elétrica (Nielen *et al.*, 1992).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado por meio do exame clínico do animal e das secreções lácteas. Segundo Fonseca e Santos (2000) e Oliveira Junior *et al.*, (2012) o teste da caneca telada ou de fundo preto é uma medida importante para o controle da mastite nos rebanhos, sendo que sua não realização pode ser considerada um fator de risco.

O *California Mastitis Test* (CMT) é um teste rápido e barato para o diagnóstico da mastite subclínica. Constitui na mistura de 2 a 3 mililitros de leite com igual quantidade de solução CMT que resulta em lise celular e aglutinação das proteínas liberadas levando a gelatinização da mistura em graus variados. De acordo com esse grau de gelatinização são atribuídos escores que se correlacionam com a quantidade de células presentes no leite, sendo um teste negativo para o CMT quando não ocorre gelatinização da mistura, o que representa um leite que apresenta CCS menor que 200.000 células/mL (Schalm e Noorlander, 1957). O CMT pode ser utilizado periodicamente para detecção de animais positivos e para seleção de quartos para cultivo bacteriano (Dingwell *et al.*, 2003).

A Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de animais sadios é de até 100.000 células/mL, entretanto como vários fatores podem alterar a CCS do leite além da infecção é necessário estabelecer um ponto de corte, que varia de 200.000 a 250.000 células/mL. A CCS aumenta nos casos de infecção como resultado, principalmente, do recrutamento de neutrófilos para a glândula para combater a infecção (Schepers *et al.*, 1997). A determinação da CCS pode ser realizada por visualização microscópica direta ou contador automático (Barkema *et al.*, 1997).

A cultura bacteriana da secreção láctea é o método padrão para diagnóstico de infecções intramamárias, sendo importante para identificar o agente causador da mastite e estabelecer um protocolo de tratamento adequado para cada agente (Morin, 2009).

2.1.5 Tratamentos da Mastite

Segundo Wenz *et al.* (2006) o primeiro passo para o tratamento da mastite clínica é a classificação dos casos em leves, moderados e graves. Para esta classificação, os parâmetros

avaliados são a temperatura retal, avaliação do grau de desidratação, motilidade rumenal e a coloração da secreção láctea, devendo o diagnóstico ser objetivo e rápido.

Para a utilização de antibióticos, cada situação deve ser avaliada individualmente. A consideração do patógeno é de suma importância, pois vacas com mastite por *Mycoplasma* ou *Pseudomonas sp.* não respondem de forma adequada ao tratamento antimicrobiano (Hess *et al.*, 2003). Segundo Neesser *et al.* (2006) o grande problema é que a maioria dos casos de mastite clínica são tratados sem realização prévia de cultura bacteriana e antibiograma, para uma correta identificação do patógeno e a obtenção de melhores resultados no tratamento antimicrobiano.

O histórico clínico de vacas acometidas deve ser levado em consideração já que vacas com mastite severa e recorrente apresentam prognóstico desfavorável e o descarte do animal pode ser necessário. Alternativas como secagem da vaca e tratamento de suporte devem ser opções para minimizar o sofrimento do animal e o controle da doença no rebanho (Morin, 2009).

O tratamento de suporte deve ser utilizado em vacas com casos de mastite clínica, juntamente com a antibioticoterapia. Este tratamento deve ser feito com fluídos eletrólitos, para auxiliar em distúrbios circulatórios e eletrolíticos (Constable *et al.*, 1998), com anti-inflamatórios esteroidais (Ziv *et al.*, 1998) e não esteroidais (Lohuis, *et al.*, 1989) para combater dor, febre e inflamação, além da utilização de ocitocina, para indução da ejeção de secreções lácteas retidas que contribuem para a multiplicação bacteriana (Hillerton e Semmens, 1999). A antibioticoterapia pode ser sistêmica, quando a vaca apresentar quadros graves da doença, ou intramamária, usada somente em casos leves depois da identificação do patógeno pela cultura bacteriana (Roberson, 2012).

2.1.6 Prevenção e Controle da Mastite

Morin (2009) cita que a erradicação da mastite de um rebanho é difícil dependendo do agente, porém esta pode ser controlada através da identificação dos patógenos causadores, redução de reservatórios de contaminação e diminuição dos riscos de transmissão. Fatores como nutrição

adequada dos animais (Kornalijnslijper *et al.*, 2003) e higiene adequada durante a ordenha são fatores primordiais para a prevenção (Morin, 2009).

A transmissão dos agentes infecciosos causadores da mastite pode ser minimizada pela implementação do programa de cinco pontos de controle da mastite, que compreende em (1) realizar a desinfecção dos tetos com solução antisséptica após a ordenha, (2) tratamento de todos os animais no momento da secagem, (3) descarte de vacas cronicamente infectadas, (4) diagnóstico e tratamento rápido dos casos de mastite clínica e (5) manutenção e uso correto da ordenhadeira (Neave *et al.*, 1969). Outras medidas que podem ser adotadas para o controle da mastite contagiosa são o uso de toalhas de papel individuais para secagem dos tetos e ordenhar os animais com mastite somente após a ordenha dos animais sem mastite (Roberson *et al.*, 1994).

Para quadros de mastite ambiental devem ser utilizados como métodos de prevenção, melhorias da higiene do ambiente e manejo correto no momento da ordenha (Radostitis *et al.*, 2007). Outras práticas como retirada da água parada ao redor do ambiente em que as vacas permanecem e fornecimento de camas secas inorgânicas, são imprescindíveis para o controle (Hogan e Smith, 2012).

Coentrão *et al.* (2008) relataram que rachaduras nas partes emborrachadas dos equipamentos de ordenha, deficiência na limpeza, falha na desinfecção das teteiras e falta de treinamento dos ordenhadores, dentre outros fatores, são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de mastite subclínica.

2.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

A resposta inflamatória da glândula mamária que na maioria das vezes traz como contaminantes as bactérias, aumenta o número de leucócitos de origem sanguínea no lúmen alveolar dos tetos. O termo células somáticas no leite tem como conceito todas as células presentes no leite oriundas do sangue e células de descamação do epitélio glandular secretor (Fonseca e Santos, 2000).

As células somáticas possuem função de defesa sendo na maioria, leucócitos polimorfonucleares. A CCS é utilizada juntamente com a cultura bacteriológica do leite para a detecção da mastite subclínica. A partir desses exames é possível escolher o melhor tratamento para a doença (Ladeira, 2001). Paes *et al.* (2003), Park *et al.* (2007) e Keefe (2012) afirmaram que a CCS é um dos parâmetros mais utilizados para avaliação da saúde da glândula mamária em diferentes espécies animais.

Souza *et al.* (2009) mostraram que a infecção intramamária foi o fator predominantemente responsável pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) de vacas leiteiras. O efeito de animal dentro de rebanho, idade da vaca (Freitas *et al.*, 2001), época do parto (Durães *et al.*, 2001) e período de lactação também influenciaram na variação da CCS de vacas leiteiras de rebanhos comerciais (Dohoo e Meek, 1982; Cunha *et al.*, 2008).

Dispositivos automáticos como o citômetro de fluxo, e contadores de partículas passaram a facilitar a contagem de grandes números de amostras facilitando o diagnóstico de casos de mastite subclínica. Ainda assim, a microscopia direta representa o método padrão de referência para contagem de células somáticas no leite (IDF 148:1991; Barkema *et al.*, 1997).

Libera *et al.* (2004) e Silveira *et al.* (2005) relataram que não houve diferença na contagem de células somáticas obtidas através da microscopia direta e o analisador eletrônico podendo os dois métodos serem utilizados.

2.2.1 Efeitos do Estágio de Lactação na Alteração da Contagem de Células Somáticas (CCS)

Imediatamente após o parto, a Contagem de Células Somáticas se encontra elevada, independentemente se a vaca esteja infectada por agentes causadores de mastite ou não (Dohoo e Meek, 1982). O colostro apresenta elevada contagem de células somáticas (Sargeant *et al.*, 2001) na primeira semana de lactação podendo permanecer assim até duas semanas pós-parto (Natzke *et al.*, 1972).

Segundo Barbosa *et al.* (2007) a quantidade de células somáticas no leite de vaca aumenta gradualmente, à medida que a lactação avança do meio para o fim. Animais com maior número de lactações apresentam também uma maior CCS (Cunha, *et al.*, 2008).

2.2.2 Definição de Mastite Através da Contagem de Células Somáticas (CCS)

Edmondson e Bramley (2004) afirmaram que no leite produzido em glândula mamária bovina sadia a CCS é usualmente menor que 50.000 células/ml de leite. Ladeira (2001) relatou que, para amostras individuais, a presença de 100.000-200.000 células/ml de leite é considerada normal. Dohoo e Leslie (1991) observaram que valores abaixo de 200.000 células/ml são indicativos de leites provenientes de vacas saudáveis. Fonseca e Santos (2000) afirmam que leite originado de vacas saudáveis possui CCS menor que 300.000 células/ml.

Em quadros de mastite subclínica, a CCS do leite pode ser maior que 200.000 células/ml, já em episódios agudos da doença a contagem pode superar as 5.000.000 células/ml (Edmondson e Bramley, 2004). Ladeira (2001) afirmou que valores superiores a 200.000 células/ml são indicativos de quadros subclínicos de mastite e Paes *et al.* (2003) mostraram que contagens superiores a $1,0 \times 10^6$ células/ml de leite devem ser utilizadas como critério para a realização de exames microbiológicos confirmativos.

2.3 QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

O leite é sintetizado pelas células mamárias e é estéril quando secretado dos alvéolos para o úbere. A contaminação geralmente ocorre por três fontes sendo elas: dentro do úbere, fora do úbere e pelos equipamentos de ordenha utilizados (Wallace, 2008).

O crescimento bacteriano no leite está relacionado ao controle da higiene no processo de ordenha, condições de armazenamento do leite e a contaminação inicial oriunda do interior da glândula mamária (Bramley e Mckinnon, 1990). A Quantificação Bacteriana (QB) serve para fazer avaliação dos métodos utilizados para a retirada do leite e seu devido armazenamento, permitindo assim avaliar os prováveis efeitos

sobre o rendimento industrial e qualidade do leite (Fonseca e Santos, 2000).

Segundo Natzke *et al.*, (1972) o período seco é o período em que ocorre o maior número de infecções intramamárias, porém no parto, essas infecções encontram-se em níveis baixos tendendo a aumentar no início do período pós parto e diminuindo com o decorrer da lactação. Para realização da Quantificação Bacteriana, Bueno *et al.* (2008) e Eckstein *et al.* (2012) relataram em seus trabalhos o uso da citometria de fluxo. Já para Blowey *et al.* (1997) e Wallace (2008) a QB deve ser realizada através da contagem da cultura bacteriana do leite em placa de Petri.

2.4 MASTITE E ISOLAMENTO BACTERIANO

A mastite é caracterizada por inflamação da glândula mamária causada por agentes físicos ou químicos, mais comumente causada por infecção bacteriana (Park *et al.*, 2007), caracterizando-se por gerar diversas alterações de caráter físico e químico do leite assim como modificações patológicas no tecido glandular. As mudanças de maior importância no leite são a perda da cor natural, a presença de grumos e grande quantidade de leucócitos (Radostits *et al.*, 2002; Keefe, 2012). A maioria das perdas é atribuída à mastite subclínica que, somente é detectada usando testes diagnósticos apropriados para o leite (Bramley *et al.*, 1981). Para a detecção da doença de forma individual ou do rebanho, um dos testes realizados de forma mais rotineira é a cultura bacteriana (Radostits *et al.*, 2002).

Apesar de existirem mais de 100 espécies microbianas possivelmente presentes na glândula mamária, somente uma pequena quantidade de micro-organismos é importante para o surgimento da maioria dos casos de mastite clínica (Bier, 1984; Quinn *et al.*, 2005). Desta forma, os agentes mais importantes são as bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma bovis*. (Radostits *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2005).

Durante todo o período de lactação, as vacas ficam sujeitas às alterações do ambiente, à exposição dos quartos saudáveis aos micro-organismos durante o processo de ordenha (Radostits *et al.*, 2002) e a contaminação entre

animais (Keefe, 2012). A maioria das novas infecções ocorre durante a fase inicial do período de secagem da vaca ou nos dois primeiros meses de lactação (Radostits *et al.*, 2002). Para diagnosticar essas infecções intramamárias com alta sensibilidade, a metodologia mais utilizada é o isolamento do mesmo micro-organismo, mais especificamente o *S. aureus*, de duas ou três amostras consecutivas obtidas com pelo menos um dia de intervalo entre elas (Buelow *et al.*, 1996).

É de suma importância lembrar que não se deve substituir a avaliação clínica dos animais bem como a avaliação individual dos quartos mamários para diagnóstico da doença pelo exame microbiológico do leite (Bartlett *et al.*, 1991). Este exame é considerado útil para o monitoramento de programas de controle de mastite, sendo que culturas negativas não necessariamente significam ausência de patógenos (Brito *et al.*, 1998).

2.4.1 Patógenos causadores de mastite

2.4.1.1 Patógenos Contagiosos

2.4.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* são cocos gram-positivos, catalase-positivos e oxidase negativos (Ladeira, 2001) com característica de formação de colônia em agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São micro-organismos resistentes, persistentes no ambiente por semanas sem hospedeiro, ocorrendo transmissão principalmente através dos mecanismos das ordenhas (Quinn *et al.*, 2005).

A infecção causada por *S. aureus* é comum na maioria dos rebanhos leiteiros, mesmo presentes todas as medidas de controle, sendo o úbere a principal fonte de infecção (Quinn *et al.*, 2005). A maior limitação para o controle desse patógeno é a baixa resposta à antibioticoterapia devido à sua sobrevivência dentro de células polimorfonucleares (Edmondson e Bramley, 2004). Essa resistência se dá pela capacidade do *S. aureus* se encapsular em determinados períodos, sendo periodicamente liberados para os tecidos levando a ocorrência de lesões posteriores (Quinn *et al.*, 2005). Latasa *et al.* (2006) afirmaram que o *S. aureus* possui um grupo de proteínas descrito como biofilmes

associados às proteínas que contribuem aumentando a persistência do patógeno no organismo e favorecendo a cronicidade da doença. Cucarella *et al.* (2004) relataram que a presença desse biofilme associado às proteínas reduz o sucesso da antibioticoterapia.

Os *S. aureus* são considerados patógenos altamente contagiosos possuindo o potencial de disseminação no rebanho, resultando elevadas taxas de Contagem de Células Somáticas (Park *et al.*, 2007; Britten, 2012). A severidade dos quadros de mastite causada por *S. aureus* varia desde a mastite aguda até quadros subclínicos e crônicos da doença sendo as bactérias excretadas juntamente com a alta Contagem de Células Somáticas (Quinn *et al.*, 2005).

2.4.1.2 Patógenos Ambientais

2.4.1.2.1 *Streptococcus* sp.

Os *Streptococcus* sp são cocos gram-positivos, catalase-negativos e anaeróbios facultativos. Com característica de formação de cadeias, vivem como comensais em diversos tecidos, possuindo certa habilidade de resistência à fagocitose por neutrófilos devido a presença de cápsula (Quinn *et al.*, 2005). As infecções causadas por *Streptococcus* sp. quase sempre levam aos quadros subclínicos de mastite, gerando impacto no aumento da Contagem de Células Somáticas (Cattell, 1996).

2.4.1.2.2 *Streptococcus uberis*

Esse patógeno está intimamente relacionado à mastite ambiental, principalmente em camas contaminadas por fezes e urina (Gabler *et al.*, 2001). Dentre os patógenos causadores de mastite ambiental, o *S. uberis* é considerado o mais importante (Leigh, 1999) e aproximadamente 50% das contaminações ocorrem durante o período seco (Todhunter *et al.*, 1995). A susceptibilidade da glândula mamária seca ao *S. uberis* aumenta com o tempo sendo que na segunda metade do período seco todos os quartos mamários estão vulneráveis à infecção (Kenny *et al.*, 2004). Essa infecção por sua vez, é sucedida por um grande recrutamento de neutrófilos para prevenção de multiplicação bacteriana resultando no aumento da Contagem

de Células Somáticas (Rambeaud *et al.*, 2003). Em quadros subclínicos da doença, Cattell (1996) afirma que a maior incidência de mastite clínica aparece até a quinta semana de lactação.

2.4.1.2.3 *Streptococcus dysgalactiae*

O *S. dysgalactiae* possui características inerentes aos patógenos contagiosos e aos ambientais (Quinn *et al.*, 2005), estando associados à condição da pele dos tetos. Podem ser isolados de tonsilas e órgãos genitais de vacas sendo ótimos infectantes e colonizadores de lesões (Edmondson e Bramley, 2004). A disseminação dessa bactéria pelo corpo, além das condições ambientais também pode ser feita por lambadura, fato esse que explica a alta frequência de mastite em vacas secas (Fonseca e Santos, 2000). A persistência na glândula mamária ocorre devido à habilidade de invasão de células epiteliais do tecido mamário, podendo ser transmitidas às outras vacas durante os procedimentos da ordenha (Quinn *et al.*, 2005).

2.4.1.2.4 Coliformes Causadores de Mastite

2.4.1.2.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um dos mais importantes microrganismos ambientais causadores da mastite bovina. As infecções ocasionadas por esse patógeno, em sua maioria, ocorrem na forma clínica nas primeiras semanas de lactação (Radostitis *et al.*, 2000). O micro-organismo também está envolvido em casos de mastite subclínica (Döpfer *et al.*, 1999). São pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e se apresentam sob a forma de bacilos gram-negativos, oxidase-negativos e anaeróbios facultativos. Na mastite, a *E. coli* é agente oportunista, geralmente levando à infecção através da contaminação dos tetos por fezes, na maioria das vezes devido ao relaxamento do esfíncter do teto (Quinn *et al.*, 2005). A contaminação também ocorre pela cama, solo, água e contato com fômites contaminados (Hogan, *et al.*, 1990), possuindo maior incidência no verão (Todhunter *et al.*, 1991).

A mastite causada por coliformes possui curta duração (Todhunter *et al.*, 1991), entretanto cerca de 10% das infecções causadas por *E.coli* podem

se tornar casos crônicos (Bradley e Green, 2001). A resposta clínica à infecção causada por *E. coli* varia de acordo com a idade da vaca e o estágio de lactação. Vacas mais velhas são mais susceptíveis devido à diminuição da função neutrofílica (Mehrzhad *et al.*, 2002). Essa bactéria não possui capacidade de fixação nas células epiteliais mamárias e as lesões mamárias são confinadas nas camadas superficiais do teto e nos ductos lactíferos. A glândula seca é muito menos responsiva às endotoxinas liberadas em relação à glândula lactante (Kenny *et al.*, 2004).

2.4.1.2.4.2 *Proteus* sp. e *Enterobacter*.

Os *Proteus* sp. são patógenos oportunistas, móveis, com crescimento invasivo. Fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, portanto são bacilos gram-negativos, oxidase-negativos e anaeróbios facultativos. Suas características quanto à mastite são semelhantes às da *E. coli* (Quinn *et al.*, 2005). Já os *Enterobacter* estão presentes em solo, água, grama e trato intestinal de animais saudáveis (Hogan e Smith, 2003). Pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são considerados patógenos oportunistas. São produtores de cápsula que inibe a fagocitose e aumenta portanto, a sobrevivência intracelular. São gram-negativos, possuindo características semelhantes à *E. coli* (Quinn *et al.*, 2005). Assim para o *Enterobacter*, como para todas as bactérias gram-negativas, as endotoxinas produzidas são consideradas o fator primário de virulência, responsáveis pelos danos teciduais nas vacas (Hogan e Smith, 2003).

2.4.1.2.5 *Pseudomonas* sp.

São bacilos gram-negativos, aeróbios obrigatórios e catalase-positivos. São móveis e aparecem no âmbito mundial, na água e solo, podendo ser encontrados também na pele, mucosas e fezes de animais portadores sadios e doentes (Quinn *et al.*, 2005).

Por serem micro-organismos psicotróficos causam preocupação nos profissionais da área de qualidade do leite e inspeção de produtos alimentícios (Santos e Fonseca, 2007). Tassell *et al.* (2012) relataram que a incubação de amostras de leite, mesmo após ter sido pasteurizado, por 48 horas a 32°C foi suficiente para crescimento de *Pseudomonas* sp. não sendo eficaz para a inativação da bactéria.

A mastite causada por *Pseudomonas* sp. está associada à água contaminada, utilizada nos procedimentos de ordenha, ou seja, lavagem e manutenção dos equipamentos e limpeza dos próprios tetos (Santos e Fonseca, 2007). Casos de mastite gangrenosa causados por *Pseudomonas aeruginosa* foram relatados por Osborne *et al.* (1981) e McLennan *et al.* (1997). Esses autores relatam que esses casos foram isolados, porém Radostitis *et al.* (2000) afirmam que esse quadro não é ocasional, faltando correto diagnóstico para identificação do patógeno.

2.4.1.2.6 *Bacillus* sp.

São bacilos gram-positivos grandes, produtores de esporos, a maioria de origem ambiental (Quinn *et al.*, 2005), presentes em grande quantidade em locais onde os animais ficam alojados entre as ordenhas (Magnusson *et al.*, 2007). Dentre o gênero que abrange aproximadamente 50 espécies, a única espécie de importância na mastite bovina é o *B. cereus*. Ainda assim, sua ocorrência é rara quando comparado com outros patógenos (Quinn *et al.*, 2005).

Sua grande importância se deve à esporulação e contaminação do leite, sendo que durante o período do verão, essa liberação de esporos torna-se maior. O teor de esporos presentes no leite está fortemente relacionado com o grau de contaminação dos tetos quando relacionado ao solo. Materiais de ordenha normalmente não estão associados na disseminação desses esporos (Christiansson *et al.*, 1999).

2.4.1.3 *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*

São patógenos gram-positivos, coagulase-negativos, por isso, menos patogênicos quando comparados ao *S. aureus*. Distribuídos por todo o mundo, são comensais na pele de animais e seres humanos, com certa estabilidade no meio ambiente (Quinn *et al.*, 2005). *S. epidermidis* em estudo realizado por Piessens *et al.* (2011) pareceu mais adaptado em sobreviver no úbere, não sendo encontrado no ambiente como fonte de infecção, enquanto que o *S. haemolyticus* foi considerado reservatório ambiental, podendo atuar como agentes oportunistas.

Segundo Thorberg *et al.* (2009), mastite subclínica causada por *Staphylococcus* coagulase-negativos é muito comum em vacas leiteiras em que o rebanho tenha algum tipo de problema de manejo. O controle da doença torna-se difícil devido ao fato de existir um alto número de espécies diferentes. Ainda, segundo os mesmos autores, a espécie mais comum em infecções persistentes subclínicas é o *S. epidermidis*. Os mesmos autores ressaltaram ainda que, na maioria dos animais avaliados neste experimento, o *S. epidermidis* e o *S. haemolyticus*, foram encontrados nas culturas de leite.

Com relação aos fatores de virulência, ou seja, a produção de substâncias para a permanência no tecido glandular mamário, a capacidade de formação de biofilmes à base de proteína como os biofilmes presentes nos *S. aureus*, que confere maior patogenicidade à bactéria, foi também confirmada para o *S. epidermidis* (Rohde *et al.*, 2007) e para o *S. haemolyticus* (Tremblay *et al.*, 2013).

2.5 PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE

2.5.1 Prevalência de Patógenos em Alguns Países do mundo

Junaidu *et al.* (2011) encontraram 52% de amostras contaminadas por bactérias de 100 amostras coletadas ocasionalmente de vacas de fazendas comerciais em Sokoto Metropolis na Nigéria. Nas amostras positivas para patógenos, 22,8% apresentaram *S. aureus*, 10,9% *S. epidermidis*, 14,1% de amostras positivas para *Streptococcus spp.*, 7,6% com *Bacillus spp.*, 9,78% com *E. coli*, 8,69% com *Proteus spp.* e 1,09% com *Enterobacter spp.*

Benhamed *et al.* (2011) coletaram amostras de leite de duas diferentes fazendas da região de Oran, oeste da Argélia. As amostras foram coletadas de quartos diferentes após utilização de técnica asséptica. As prevalências encontradas foram 30,76% para *S. aureus*, 30,76% para *Streptococcus sp.* e 23,07% para *E. coli*.

Na Alemanha, Tenhagen *et al.* (2006) avaliaram a prevalência de quatro grupos clinicamente saudáveis: primeira lactação, mais de uma

lactação, mais de 50 dias em lactação e mais de 250 dias de lactação. Encontraram prevalência para o *S. aureus* de 5,7%, *S.uberis* de 1,0%, *Streptococcus spp.* de 0,8% e coliformes de 0,3%. Comparativamente entre os tempos, concluíram que o *S. aureus* foi predominantemente o patógeno mais encontrado, aumentando sua prevalência com a idade da vaca e o estágio de lactação, enquanto o *S.uberis* foi o patógeno ambiental mais prevalente no experimento.

Na China, em experimento realizado por DaRong *et al.* (2010), em que foram coletadas amostras de leite de abril a maio de 2009, de cinco fazendas leiteiras com vacas apresentando mastite clínica e subclínica, a prevalência encontrada para *E.coli* foi de 82%, para o *S. uberis* de 53%, para o *S.aureus*, 41%, *S. dysgalactiae* de 29% e *S. epidermidis* de 15%. Ainda na região nordeste da China. Yuan-Yuan *et al.* (2012) realizaram um estudo para verificar a prevalência de mastite subclínica e patógenos prevalentes em 1.860 vacas no período de junho a setembro de 2011. As bactérias predominantes no estudo foram *Staphylococcus aureus* com 36% de prevalência, *Staphylococcus* coagulase-negativo com 26,9%, *S. Dysgalactiae* com 7,3%, *S. uberis* com 2,0%, *E. coli* com 12,4%, *Proteus* com 2,0% e *Pseudomonas sp.* com 2,5% de prevalência.

Em Gondar, na Etiópia, Moges *et al.* (2011) encontraram em 322 vacas selecionadas aleatoriamente de setembro de 2010 a fevereiro de 2011 16,5% de prevalência de *S. aureus* e 14% de *S. dysgalactiae*.

2.5.2 Prevalência de Patógenos em Alguns Estados do Brasil

No estado de Minas Gerais, Ferreira *et al.* (1981) avaliaram em 27 municípios da Zona da Mata, 118 fazendas e um total de 3.779 vacas em lactação e observaram prevalência de 30,49% para o *S. aureus*, 16,09% para o *S. epidermidis*, 5,35% para o *S. dysgalactiae* e 3,57% para o *S. uberis*.

No Mato Grosso, na microrregião de Cuiabá, Martins *et al.* (2010) pesquisaram a prevalência de patógenos em 108 vacas. Em casos de mastite subclínica, os agentes bacterianos mais isolados foram o *Corynebacterium spp.* com 27,6% e o *S.*

aureus com prevalência de 21,5%. Nos casos de mastite clínica, os agentes encontrados foram o *S. aureus* com 44% e *Corynebacterium* spp. com 12% de prevalência.

Em São Paulo, Laranja e Machado (1994) avaliaram, entre os meses de março de 1991 e Fevereiro de 1992, a prevalência de patógenos causadores de mastite em 7 fazendas de diferentes regiões, com o total de 1683 vacas analisadas. Das amostras positivas para algum tipo de patógeno, 44,6% foram positivas para *S. aureus*, seguido por *Streptococcus* sp. (8,2%), *Bacillus* sp. (4,4%), *E.coli* (3,2%).

No Pará, Oliveira *et al.* (2011) relataram que, em 237 vacas mestiças em diferentes fases de lactação avaliadas, em 9 propriedades, as bactérias isoladas e suas respectivas prevalências na mastite clínica foram: o *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (25%), *S. aureus* (16,7%), *Streptococcus* spp. (8,3%) e *Corynebacterium* spp. (8,3%). Na mastite subclínica, encontraram *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (32,3%), *S. aureus* (17,7%), *S. intermedius* (1,6%), *Streptococcus* spp. (4,8%) e *Corynebacterium* spp. (4,8%).

Em Goiás, Andrade *et al.* (1998) mostraram em seus estudos que, das 942 vacas de 25 propriedades, a prevalência de *S. aureus* foi 30,2%, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo 11,6%, *S. uberis* 3,7%, *Streptococcus* spp. 6,9%, *Pseudomonas* spp. 10% e *E. coli* 6,2%.

2.6 MINERAIS

2.6.1 Cálcio

É o mais abundante mineral do corpo, seguido pelo fósforo (Favus, *et al.*, 2006). Aproximadamente 1% de todo o cálcio presente no corpo é encontrado em fluidos extracelulares, estruturas intracelulares e membranas celulares, atuando muitas vezes como segundo mensageiro em sinais extracelulares. O cálcio atua também na contração muscular, secreção glandular e transmissão nervosa. O restante do cálcio é encontrado nos ossos e dentes, sendo suas propriedades químicas essenciais para função esquelética (Awumey e Bukoski, 2006).

No leite de vaca, 99% do cálcio se encontra na fração desnatada, enquanto que no leite humano, 16% se encontra na fração lipídica ligada à gordura do glóbulo da membrana (Fransson e Lonnerdal, 1983), sendo que dois terços do total de cálcio ocorrem na forma coloidal associada com micelas de caseína, o terço restante se encontra na forma solúvel. O cálcio ionizado na fase solúvel equivale à 10% do cálcio total (Gaucheron, 2005). A concentração de cálcio no leite é influenciada por vários fatores como espécie e raça, estágio de lactação e alimentação (Tamime, 2009).

Lin *et al.* (2006) observaram que o melhor aparelho para mensuração do cálcio no leite foi o Ciba Corning 634 ISE Ca²⁺/pH Analyser® para mensuração de analitos sanguíneos, porém calibrado adequadamente para leituras da concentração de cálcio no leite com reagentes específicos para o aparelho em questão.

Cerbulis e Farrel Jr. (1975) determinaram a presença de cálcio no leite de vacas holandesas no meio da lactação, porém, não especificaram o tempo de lactação. A média dos valores encontrados foi $1,21 \pm 0,18$ g/L.

Rodríguez *et al.* (2001) mensuraram a concentração de cálcio do leite de vacas das Ilhas Canário através da diluição de três mililitros de leite em 10 mililitros de HNO₃:HClO₄ na proporção de 9:1 e utilizaram para este fim espectrofotômetro de absorção atômica. Encontraram média de 1.653 ± 207 mg/L, porém, os autores não fizeram separação das dosagens por tempo de lactação.

Tsioulpas *et al.* (2007) encontraram valores da concentração de cálcio utilizando também o aparelho Ciba Corning 634 ISE Ca²⁺/pH Analyser®. No colostro, encontraram valores de $54,2 \pm 6,7$ mMol. Esses valores apresentaram redução significativa aos 5 dias de lactação ($36,2 \pm 3,2$ mMol), aos 30 dias de lactação ($30,3 \pm 2,2$), mantendo-se semelhantes aos 60 dias de lactação ($28,3 \pm 3,5$ mMol) e 90 dias de lactação ($28,6 \pm 2,1$ mMol).

Ceballos *et al.* (2009) mensuraram valores para o cálcio através da espectrofotometria de absorção atômica do leite de vacas de raça holandesa com pelo menos duas lactações seguidas, as amostras

variavam do primeiro ao último mês de lactação. Encontraram média de 113,58 mg/100g de leite.

El-Fattah *et al.* (2012) avaliaram o colostro imediatamente pós-parto e cinco dias pós-parto de vacas holandesas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-AES) para mensurar a concentração de cálcio. As médias encontradas para as vacas holandesas foram $281,40 \pm 2,01$ mg/100g e $115,20 \pm 0,80$ mg/100g respectivamente, possuindo queda significativa entre os grupos.

2.6.2 Fósforo

O fósforo se encontra intimamente relacionado ao cálcio (Ferreira *et al.*, 2004) e juntamente com ele, é responsável pela estruturação de ossos e dentes. É constituinte de várias moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Holt (1985) afirmou que 56% do cálcio solúvel no leite se encontra na forma de íons fosfato. Também como para o cálcio, a concentração é influenciada por fatores como raça, alimentação, espécie e estágio de lactação (Tamime, 2009). A concentração de fósforo inorgânico no leite é muito mais alta na primeira lactação do que em vacas múltiparas. O fósforo é transportado contra o gradiente de concentração do plasma para o leite e não é afetado diretamente por mudanças do fósforo inorgânico no plasma sanguíneo, mas sim influenciado por fatores como número de lactações, produção leiteira e mês do parto (Forar *et al.*, 1982).

Cerbulis e Farrel Jr., (1975) determinaram a presença de fósforo no leite de vacas holandesas no meio da lactação, porém, não especificaram o tempo de lactação. Para a determinação do fósforo foi utilizada a metodologia do azul de molibdênio. A média dos valores encontrados foram $0,985 \pm 0,203$ g/L.

Tsioulpas *et al.* (2007) encontraram valores da concentração de fósforo utilizando o aparelho Ciba Corning 634 ISE Ca²⁺/pH Analyser®. No colostro, encontraram valores de $52,8 \pm 8,6$ mMol/L. Esses valores apresentaram queda significativa aos 5 dias de lactação ($32,2 \pm 2,3$ mMol/L), aos 30 dias de lactação ($25,1 \pm 3,8$ mMol/L), mantendo-se semelhantes aos 60 dias de lactação ($23,0 \pm 1,4$ mMol/L) e 90 dias de lactação ($27,4 \pm 1,6$ mMol/L).

Ceballos *et al.* (2009) mensuraram valores para o fósforo através da espectrofotometria de absorção atômica do leite de vacas de raça holandesa com pelo menos duas lactações seguidas, as amostras variavam do primeiro ao último mês de lactação. Encontraram média de 87,04 mg/100g de leite.

El-Fattah *et al.* (2012) avaliaram o colostro imediatamente pós-parto e cinco dias pós-parto de vacas holandesas por colorimetria para mensurar a concentração de fósforo. As médias encontradas para as vacas holandesas foram $53,00 \pm 1,09$ mg/100gramas e $55,50 \pm 1,10$ mg/100gramas respectivamente, possuindo aumento significativo entre os grupos.

2.6.3 Magnésio

É o cátion bivalente mais prevalente e necessário para as reações enzimáticas vitais ao metabolismo como a síntese de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e Ácido Ribonucleico (RNA) (Volpe, 2006). Atua na regulação intracelular de cálcio e potássio a nível de membrana celular sendo portanto, controlador na transmissão nervosa, esquelética, contração muscular, excitação cardíaca dentre outros (Hunt e Nielsen, 2009).

O leite de vaca é pobre de magnésio, em que sua maior concentração é encontrada no período colostrado, decaindo durante os três primeiros dias de lactação (Jarrett, 1979; Hazell, 1985; Souza *et al.*, 2009). O magnésio é encontrado quase em sua totalidade na porção desnatada (Fransson e Lonnerdal, 1983), com 65% na forma solúvel. O restante se encontra associado às micelas de caseína (Holt, 1985). O leite bovino contém aproximadamente 100 mg de magnésio por litro (Volpe, 2006) e sua concentração no leite não é afetada pela ingestão na dieta (Hunt e Nielsen, 2009).

Cerbulis e Farrel Jr. (1975) determinaram a presença de magnésio no leite de vacas holandesas no meio da lactação, porém, não especificaram o tempo de lactação. A média dos valores encontrados foram $0,120 \pm 0,08$ g/L.

Rodríguez *et al.* (2001) mensuraram a concentração de magnésio do leite de vacas das Ilhas Canário através da diluição de três ml de leite em 10 ml de HNO₃:HClO₄ na proporção de

9:1 e utilizaram para este fim espectrofotômetro de absorção atômica. Encontraram a média de $113,9 \pm 18,7$ mg/L, porém, os autores não fizeram separação das dosagens por tempo de lactação.

Tsioulpas *et al.* (2007) encontraram valores da concentração de magnésio utilizando também o aparelho Ciba Corning 634 ISE Ca²⁺/pH Analyser®. No colostro, encontraram valores de $12,1 \pm 1,4$ mMol/L. Esses valores apresentaram redução significativa aos 5 dias de lactação ($5,9 \pm 2,3$ mMol/L), aos 30 dias de lactação ($5,2 \pm 3,2$ mMol/L) mantendo-se semelhante aos 60 dias de lactação ($4,7 \pm 3,5$ mMol/L) e 90 dias de lactação ($4,4 \pm 2,1$ mMol/L).

Ceballos *et al.* (2009) mensuraram valores para o magnésio através da espectrofotometria de absorção atômica do leite de vacas de raça holandesa com pelo menos duas lactações seguidas, as amostras variaram do primeiro ao último mês de lactação. Encontraram média de 9,40 mg/100g de leite.

El-Fattah *et al.* (2012) avaliaram o colostro imediatamente pós-parto e cinco dias pós-parto de vacas holandesas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-AES) para mensurar a concentração de magnésio. As médias encontradas para as vacas holandesas foram $42,86 \pm 0,88$ mg/100g e $14,35 \pm 0,17$ mg/100g respectivamente, possuindo diferença significativa entre os grupos.

2.6.4 Cloreto

O cloreto é o principal ânion extracelular e essencial para a manutenção de fluidos e balanço eletrolítico (Fox, 1997). A concentração de cloretos na lactação decresce do colostro para o leite comparado à fase pós-colostral, mas aumenta consideravelmente no fim da lactação independente da dieta oferecida ao animal (Kirchgeßner *et al.*, 1967; Holt, 1993).

Quase todo cloreto presente no leite se encontra na forma de íons livres (Holt, 1993), assim sendo, grandes elevações de cloreto no leite são indicativas de inflamação da glândula mamária e essas mudanças quando detectadas podem ser usadas para diagnóstico de mastite subclínica (Edmondson e Bramley, 2004).

Morsi, *et al.* (2000) afirmaram que patógenos causadores de mastite aumentam a concentração de cloreto no leite e Zafalon *et al.* (2005) relataram que a condutividade elétrica e a dosagem do conteúdo de cloretos no leite quando realizadas conjuntamente, apresentaram eficiência semelhante para diagnóstico de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium*.

Bruckmaier *et al.* (2004) afirmaram que, em quartos afetados por infecção, a concentração de cloreto varia entre 41-45 ml/L, porém, a alteração da composição do leite é dependente da severidade da infecção mamária, pois vários componentes sintetizados na glândula mamária não variam durante a infecção.

2.7 ENZIMAS

2.7.1 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é um homo dímero com duas subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de 85 KDa. Contém quatro átomos de zinco, que são essenciais para sua atividade enzimática, sendo ativada também pelo íon magnésio. Sua atividade ótima ocorre em pH 10,5 quando analisada em nitrofenilfosfato, mas esse pH cai para 6,8 quando analisada em caseinato. A temperatura ideal é de 37°C (Linden *et al.*, 1974; Linden e Alais, 1978).

A fosfatase alcalina é importante para o processamento do leite, pois é utilizada para verificação da eficiência da pasteurização com sua inativação (Tinôco *et al.*, 2002). No entanto, há provas de que a ALP pode ser reativada. Esse mecanismo está ligado à membrana e vários fatores como íons magnésio e zinco promovendo forte reativação, enquanto que os íons estanho, cobre, cobalto e Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) atuam de forma inibitória. Já os íons ferro não alteram a inativação dessa enzima (Andrews, *et al.*, 1992; Fox, 2003; Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2003). McKellar *et al.* (1994) afirmaram que a ALP não é a enzima mais apropriada para a avaliação da pasteurização em curto tempo devido ao processo de reativação da enzima.

A maioria da fosfatase alcalina presente na glândula mamária é proveniente das células

mioepiteliais sugerindo um papel na ejeção láctea. Por outro lado, há baixa atividade de ALP nas células epiteliais da glândula mamária (Binghan, *et al.*, 1992). Durante a lactação, a ALP é encontrada em níveis elevados na fase colostrar, vindo a diminuir entre uma a duas semanas após o parto e se mantendo constante durante as vinte e cinco semanas de lactação subseqüentes (Kiermeier e Meinl, 1961), sendo que a mastite causa considerável elevação da atividade de ALP (Singh e Ganguli, 1975). Zarrilli *et al.* (2003) encontraram valores para a ALP entre 150 a 1000 u/L no colostro de ovelhas.

2.7.2 Gama-Glutamil Transferase

A gama-glutamil transferase (GGT) é uma glicoproteína que possui doze isoenzimas diferindo entre elas pela quantidade de ácido siálico. É um dímero de subunidades de peso molecular de 46 e 22 KDa (Tate e Meister, 1976). Possui atividade ótima em pH entre 8,5 e 9,0 (Kenny, 1977). Como função, a GGT atua na regulação da transferência de glutatona para aminoácidos ou peptídeos (Viña *et al.*, 1989) e pode estar envolvida no transporte de aminoácidos a partir do sangue para a glândula mamária (Viña *et al.*, 2001) e assim atuar na biossíntese de proteínas do leite (Baumrucker e Pocius, 1978). Johnston *et al.* (2004) afirmaram que a inibição da atividade da GGT das células mamárias durante a lactação em ovinos, induziu a uma queda significativa da sintetização de proteínas presentes no leite.

Na tecnologia do leite a GGT é de interesse principalmente por causa de suas características de estabilidade térmica (O'Mahony *et al.*, 2013). Andrews *et al.* (1987) observaram que a GGT presente no leite é apropriada para monitorar tratamentos térmicos no leite em que a temperatura varia entre 70-80°C por 16 segundos, pois a mesma é inativada a esta temperatura.

A GGT é absorvida a partir do trato gastrointestinal de recém-nascidos durante as quatro primeiras horas de vida (Braun *et al.*, 1982), resultando na alta concentração no soro sanguíneo de animais alimentados com o colostro ou no início da lactação (Farkye, 1992). Desde que a GGT é inativada por tratamento térmico ao qual são submetidas as fórmulas para lactentes, o nível de atividade da GGT no soro

sanguíneo em lactentes pode ser utilizado para distinguir animais amamentados com leite dos animais alimentados com a fórmula (Farkye, 1992).

Essa enzima também é secretada pelo tecido mamário, e no leite, está ligada às membranas da pele e glóbulos de gordura, sendo a sua atividade influenciada pelo estágio de lactação (Fox, 1997), possuindo alta atividade na fase colostrar (Pero *et al.*, 2006; Franciosi *et al.*, 2009).

Ontsouka *et al.* (2003) avaliaram 16 vacas mestiças (Simental x Holandesa), para a determinação da concentração de GGT do colostro (dois dias pós-parto) e 30 dias de lactação. Para estes fins, utilizaram o aparelho automático Cobas Miras Plus, F. Hoffmann-La Roche®, realizando coagulação do leite com quimosina e kits específicos para este aparelho. Como resultado encontraram a GGT alta no colostro de 137 ± 9 μ kat/L o que equivale à aproximadamente 8.218,35 U/L e uma redução significativa aos 30 dias de lactação com valores de 24 ± 8 o que corresponde à aproximadamente 1.439,71 U/L.

De acordo Zanker *et al.* (2001) a atividade enzimática da GGT é alta no colostro decrescendo gradualmente com o passar do tempo de lactação. Zarrilli *et al.* (2003) encontraram valores entre 8.000 à 23.000 U/L para a GGT presente no colostro de ovelhas. Pero *et al.* (2006) encontraram ainda, altos níveis de atividade da GGT na glândula mamária de búfalas aos 120 dias de lactação. Já aos 180 dias, os valores encontrados e confirmados através da histoquímica, foram semelhantes aos de búfalas não lactantes.

2.8 CÉLULAS

2.8.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são células sanguíneas de origem medular possuindo como precursores as células mieloblásticas, pró-granulocíticas, mielocíticas, metamielocíticas e neutrófilos bastonetes nesta ordem, que sofrem maturação e são liberados na corrente sanguínea através de sinusoides medulares. Possuem meia-vida de 5 a 10 horas antes da penetração nos tecidos e quando maduras possuem maior capacidade de migração

tecidual. Essa penetração ocorre por mediação de substâncias quimiotáticas que promovem migração de neutrófilos para locais específicos (Stockhan e Scott, 2011).

Segundo Jain (1986), em vacas com mastite aguda, a neutropenia inflamatória, ou seja, a diminuição da concentração de neutrófilos na corrente sanguínea por uma maior migração tecidual devido à inflamação é comum, pois esses animais possuem um sistema de estoque (CAN- Compartimento de Armazenamento de Neutrófilos) pequeno. Após a neutropenia inicial, que dura aproximadamente 6 horas, a vaca passa por um desvio à esquerda significativo, ou seja, um aumento de neutrófilos não segmentados (bastonetes ou outras células precursoras) na corrente sanguínea ao redor de 24 horas. Próximas às 31 horas ocorre o nadir de neutropenia, onde são encontrados os menores valores de neutrófilos na corrente sanguínea. Wenz *et al.* (1999) afirmam que a gravidade da neutropenia é dependente da ocorrência de bacteremia juntamente com a mastite.

Os neutrófilos são as células predominantes no leite de vacas com mastite, com concentrações excedendo 1 milhão/ml durante a infecção aguda (Morin, 2009). São importantes para eliminação de patógenos causadores de infecção na glândula mamária. Para isso, ocorre primeiramente o recrutamento de neutrófilos sendo dependentes de fatores quimiotáticos como a interleucina - 8 e o fator de complemento C5a, provenientes de macrófagos e células epiteliais (Rainard, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). Em resposta aos mediadores inflamatórios, as células endoteliais expressam receptores que auxiliam na expressão de determinados complexos de adesão que atuam na ancoragem de neutrófilos intravasculares para posterior diapedese na glândula mamária. Esses neutrófilos migram de acordo com o gradiente quimiotático até atingir o ápice da infecção (Rainard e Riollot, 2003).

Em uma segunda fase, há ocorrência de fagocitose dos patógenos. Os neutrófilos passam a ser ativados através da diapedese e de substâncias quimiotáticas. Essa ativação resulta em maior quantidade de receptores. Esses, reconhecem componentes específicos da parede bacteriana (Bannerman *et al.*, 2005) e facilitam a emissão de pseudópodes para posterior fagocitose (Paape *et al.*, 2003). Os grânulos dos

neutrófilos atuam na destruição de micro-organismos, através de peptídeos de largo espectro antibacteriano e antifúngico (Mehrzaad *et al.*, 2005). Esses peptídeos associados com lactoferrina e enzimas hidrolíticas contribuem para total eliminação de micro-organismos (Morin, 2009). A apoptose celular finaliza esse processo fragmentando neutrófilos em pequenos pedaços ligados à membrana que são facilmente removidos e fagocitados por macrófagos (Boutet *et al.*, 2004). A grande concentração predominantemente de neutrófilos no leite é indicativo de doença da glândula mamária (Kehrli e Shuster, 1994). No entanto, essa concentração de neutrófilos no leite não varia de acordo com o estágio de lactação e tão pouco com o número de lactações segundo Kelly *et al.* (2000).

Dulin *et al.* (1982) obtiveram valores próximos à 62,5% de neutrófilos no leite através da confecção do esfregaço em lâmina corado com Wright modificado de trinta vacas, porém, eles não verificaram essa porcentagem no decorrer da lactação. A contagem em lâmina não diferiu estatisticamente da metodologia que utiliza a citocentrífuga e posterior preparo de lâminas para obtenção do diferencial celular em vacas híidas.

Miller *et al.* (1991) encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 32,4% e 21,5% de neutrófilos, respectivamente, utilizando citocentrífuga e posterior preparo de lâminas, de leite de vacas primíparas, valores que não apresentaram diferença estatística.

Droke *et al.* (1993) realizaram o diferencial celular do leite em lâminas de 71 cabras em vários estágios de lactação e duas semanas antes da secagem das cabras. A coleta de amostra foi realizada em tanques de armazenamento. Encontraram média de 87,3% de neutrófilos.

Paape *et al.* (2001) relataram que em cabras sem infecção intramamária a concentração de neutrófilos no leite varia de 45 a 74% do total das Células Somáticas e em cabras com infecção, esse valor varia de 71 a 86%.

Dosogne *et al.* (2003) encontraram valores de neutrófilos para o início da lactação (aproximadamente 30 dias) e para o meio da lactação (aproximadamente 180 dias) em vacas

holandesas. A metodologia utilizada foi a da citocentrífuga com preparo de lâminas. No início da lactação a porcentagem de neutrófilos foi entre 10% e 20% e no meio da lactação foi mais próximo de 30%.

Sarikaya *et al.* (2006) avaliaram em quatro grupos de vacas de diferentes raças e diferentes estágios de lactação, o diferencial celular através da microscopia óptica. Esses autores constataram que a população celular varia de acordo com o aumento de células somáticas. Os neutrófilos se sobressaíram sempre em que houve aumento da Contagem de Células Somáticas.

Schwartz *et al.* (2011a) estudaram 80 amostras de leite provenientes de 20 vacas holandesas de diferentes idades e estágios de lactação via citômetro e observaram que a população de neutrófilos variou entre 4,48% e 85,27% do diferencial realizado, sendo a média de 48,5%.

Schwartz *et al.* (2011b) em estudo com 20 vacas em boas condições de saúde e sem histórico de mastite, realizaram diferencial celular no leite e encontraram média geral de neutrófilos de 19,94%.

Pilla *et al.* (2012) avaliaram em seus estudos amostras de leite de 48 vacas selecionadas de três fazendas aleatoriamente sem diferenciação de tempo de lactação nem do número de lactações. Para a diferenciação celular foi realizado o preparo de lâminas após a utilização de citocentrífuga e usada a coloração de Grünwald-Giemsa. Na fazenda A, encontraram a média do valor de 58,68% de neutrófilos no leite. Na fazenda B, a média do valor encontrado foi 67,03% de neutrófilos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 31,79% de neutrófilos no leite.

2.8.2 Linfócitos

A produção e maturação de linfócitos ocorre nos linfonodos, baço e timo, que contém precursores de linfócitos B, T e Nulos. Após a diferenciação estimulada por agentes mediadores de linfócitos B e T, deixam os linfonodos pelos vasos linfáticos passando a circular pela corrente sanguínea e através dela, penetram nos tecidos. Essa migração ocorre por quimiotaxia e ligação a receptores endoteliais (Stockhan e Scott, 2011).

No leite, linfócitos T CD8⁺ (os supressores que possuem memória citotóxica) superam os linfócitos T CD4⁺ (auxiliares). Entretanto, essas porcentagens podem variar com o estágio de lactação (Park *et al.*, 1992).

Dulin *et al.* (1982) obtiveram valores aproximados à 0,7% de linfócitos no leite através da confecção do esfregaço em lâmina corado com Wright modificado de trinta vacas, porém, eles não verificaram a contagem no decorrer da lactação. A contagem em lâmina não diferiu estatisticamente da contagem obtida a partir da citocentrífuga e posterior preparo de lâminas para obtenção do diferencial celular em vacas híidas.

Miller *et al.* (1991) encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 24,3% e 22% respectivamente de linfócitos utilizando citocentrífuga e posterior preparo de lâminas, de leite de vacas primíparas, sem diferença estatística entre eles.

Droke *et al.* (1993) realizaram o diferencial celular do leite em lâminas de 71 cabras em vários estágios de lactação e duas semanas antes da secagem das cabras. A coleta de amostra foi realizada em tanques de armazenamento. Encontraram média de 2,8% de linfócitos.

Paape *et al.* (2001) relataram que em cabras sem infecção intramamária, a concentração de linfócitos no leite varia de 9 a 20% do total das Células Somáticas e em cabras com infecção, esse valor varia de 5 a 11%.

Dosogne *et al.* (2003) encontraram valores de linfócitos para o início da lactação (aproximadamente 30 dias) e para o meio da lactação (aproximadamente 180 dias) em vacas holandesas. A metodologia utilizada foi a da citocentrífuga com preparo de lâminas. No início da lactação a porcentagem de linfócitos foi entre 70% e 80% e no meio da lactação foi entre 50% e 60%.

Sarikaya *et al.* (2006) avaliaram em quatro grupos de vacas de diferentes raças e diferentes estágios de lactação, o diferencial celular através da microscopia óptica. Esses autores constataram que a população celular varia de acordo com o aumento de células somáticas. Esse estudo observou, ainda, que os linfócitos compõem uma

pequena porcentagem do total de células somáticas e decai com a elevação da Contagem de Células Somáticas.

Schwartz *et al.* (2011a) estudaram 80 amostras de leite provenientes de 20 vacas holandesas de diferentes idades e estágios de lactação via citômetro e observaram que a população de linfócitos variou entre 2,37% e 87,75% do diferencial realizado, sendo a média de 29,76%. Esse estudo também mostrou que os linfócitos são o tipo celular predominante quando as glândulas mamárias estão em perfeita condição de saúde.

Schwartz *et al.* (2011b) em estudo com 20 vacas em boas condições de saúde e sem histórico de mastite, realizaram diferencial celular no leite e encontraram média geral de linfócitos de 44,56%.

Pilla *et al.* (2012) avaliaram em seus estudos amostras de leite de 48 vacas selecionadas de três fazendas aleatoriamente sem diferenciação de tempo de lactação nem do número de lactações. Para a diferenciação celular foi realizado o preparo de lâminas após a utilização de citocentrífuga e usada a coloração de Grünwald-Giemsa. Na fazenda A, encontraram a média do valor de 28,97% de linfócitos no leite. Na fazenda B, a média do valor encontrado foi 20,05% de linfócitos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 25,56% de linfócitos no leite.

2.8.3 Macrófagos

Os monócitos são originários na medula óssea provenientes das mesmas células-tronco que os neutrófilos e se diferencia deste por meio de citocinas específicas. Se desenvolvem a partir de monoblastos e promonócitos, fazendo migração tecidual após ligação às células endoteliais e, quando presentes nos tecidos sofrem diferenciação em macrófagos (Stockhan e Scott, 2011). Os macrófagos atuam fazendo ingestão de micro-organismos provocando a morte dos mesmos. Mesmo assim, essas células juntamente com os neutrófilos são mais lentas em realizar suas funções no leite que no sangue (Mullan *et al.*, 1985). Em vacas saudáveis, a concentração de macrófagos excede a concentração de neutrófilos, invertendo esse quadro quando ocorrem casos de mastite (Schwarz *et al.*, 2011a).

Os macrófagos também possuem a função de processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (Ordillo *et al.*, 1997).

Dulin *et al.* (1982) obtiveram valores aproximados à 36,5% de macrófagos no leite através da confecção do esfregaço em lâmina corado com Wright modificado de trinta vacas, porém, eles não verificaram no decorrer da lactação.

Miller *et al.* (1991) encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 25,1% e 36,9% respectivamente de macrófagos, utilizando citocentrífuga e posterior preparo de lâminas de leite de vacas primíparas, sem significância estatística entre eles.

Droke *et al.* (1993) realizaram o diferencial celular do leite em lâminas de 71 cabras em vários estágios de lactação e duas semanas antes da secagem das cabras. A coleta de amostra foi realizada em tanques de armazenamento. Encontraram média de 9,9% de macrófagos.

Paape *et al.* (2001) relataram que em cabras sem infecção intramamária, a concentração de macrófagos no leite varia de 15 a 41% do total das Células Somáticas e em cabras com infecção intramamária, esse valor varia de 8 a 18%.

Dosogne, *et al.* (2003) encontraram valores de macrófagos para o início da lactação (aproximadamente 30 dias) e para o meio da lactação (aproximadamente 180 dias) em vacas holandesas. A metodologia utilizada foi a da citocentrífuga com preparo de lâminas. No início da lactação a porcentagem de macrófagos foi entre 0% e 10% e no meio da lactação foi de aproximadamente 10%.

Sarikaya *et al.* (2006) avaliaram, em quatro grupos de vacas, de diferentes raças e diferentes estágios de lactação, o diferencial celular através da microscopia óptica. Esses autores constataram que a população celular varia de acordo com o aumento de células somáticas. Esse estudo observou ainda que os macrófagos foram as células predominantes em um dos quatro grupos e que a concentração dessa célula diminui com a elevação das células somáticas.

Schwartz *et al.* (2011a) estudaram 80 amostras de leite provenientes de 20 vacas holandesas de

diferentes idades e estágios de lactação via citômetro e observaram que a população de macrófagos variou entre 2,37% e 55,71% do diferencial realizado, sendo a média de 21,74%. Schwartz *et al.* (2011b) em estudo com 20 vacas em boas condições de saúde e sem histórico de mastite, realizaram diferencial celular no leite e encontraram média geral de macrófagos de 34,85%.

Pilla *et al.* (2012) avaliaram em seus estudos amostras de leite de 48 vacas selecionadas de três fazendas aleatoriamente, sem diferenciação de tempo de lactação, nem do número de lactações. Para a diferenciação celular foi realizado o preparo de lâminas após a utilização de citocentrífuga e usada a coloração de Grünwald-Giemsa. Na fazenda A, encontraram a média do valor de 12,35% de macrófagos no leite. Na fazenda B, a média do valor encontrado foi 12,92% de macrófagos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 42,65% de macrófagos no leite.

2.8.4 Eosinófilos, Células Epiteliais e Basófilos

A produção de eosinófilos na medula óssea é estimulada por mediadores específicos. Os eosinófilos do sangue circulante e marginais, podem permanecer por minutos a horas na circulação sanguínea, morrendo nos tecidos sem quantidade de tempo definida para esta morte. Possuem função fagocitária e bactericida (Stockhan e Scott, 2011).

Dulin *et al.* (1982) obtiveram valores aproximados à 0,3% de eosinófilos no leite de vacas através da confecção do esfregaço em lâmina corado com Wright modificado de trinta vacas. Já Della Libera *et al.* (2004) realizaram diferenciação celular do leite de uma única coleta de 28 búfalas sem quadros clínicos de mastite em São Paulo por utilização de citocentrífuga e posterior preparo de lâminas. Obtiveram valor médio de 0,7% de eosinófilos. Silva e Silva, (1994) relataram que encontraram no leite de búfalas sadias a média do valor de 5% de eosinófilos. Esses trabalhos não mensuraram a porcentagem de eosinófilos no decorrer da lactação e nem especificaram em qual momento da lactação os experimentos foram realizados.

Embora os leucócitos sejam considerados as células mais importantes para a defesa da glândula mamária, as células epiteliais são reconhecidas por atuar na mediação da resposta imune inata na infecção. Receptores presentes nas células epiteliais reconhecem componentes específicos bacterianos dando início à cascata de eventos que causa a produção de citocinas e agentes quimiotáticos (Gray *et al.*, 2005; Rainard e Riollet, 2006).

Dulin *et al.* (1982) reportaram que as células epiteliais equivalem à menos de 1% de todas as células presentes no leite. Contreras *et al.* (1998) afirmaram que a porcentagem de células epiteliais presentes no leite de cabras em glândulas não infectadas equivale à 6% do total de células.

Miller *et al.* (1991) encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 17,4% e 19,6% respectivamente de células epiteliais, utilizando citocentrífuga e posterior preparo de lâminas de leite de vacas primíparas, sem significância entre eles. Ribas (1999) afirmou que do total de células somáticas presentes no leite de vaca, somente 2 a 25% são células epiteliais.

Capuco *et al.* (2001) relataram que as células epiteliais mamárias de vacas diminuem em número com o decorrer da lactação (aproximadamente 50% em toda a lactação). Já em leite de búfalas, estudos como o de Silva e Silva (1994) reportaram que o valor de células epiteliais encontrado é de 5%. Dhakal *et al.* (1992) concluíram que há o predomínio de células epiteliais no leite dessa espécie.

Os Basófilos são originários da medula óssea sendo o granulócito de menor concentração no sangue de mamíferos domésticos. Seu processo de maturação é exclusivamente medular ocorrendo em torno de dois dias e meio (Dvorak e Monahan, 1985). Uma vez no sangue periférico, o tempo de vida é de aproximadamente seis horas podendo viver por aproximadamente duas semanas quando realizam migração tecidual (Hirai *et al.*, 1997). No tecido, os basófilos se acumulam ao redor da inflamação, fazendo a migração por agentes quimiotáticos (Min, 2008), essas células porém, possuem potencial fagocítico mínimo atuando com maior intensidade na defesa contra helmintos (Murphy *et al.*, 2008).

Albenzio *et al.* (2004) avaliaram o leite de 100 ovelhas durante o início, o meio e o fim da lactação no sul da Itália. Encontraram a média da concentração de basófilos para o início de lactação de 1,14%, para o meio da lactação de 1,16% e para o fim de lactação de 1,58%.

3 OBJETIVOS GERAIS

- Identificar quadros de mastite subclínica através da Contagem de Células Somáticas e verificar o comportamento das mesmas perante a presença infecções bacterianas na glândula mamária no decorrer dos seis primeiros meses de lactação e correlacionar a contagem de células somáticas com a contagem bacteriana total;
- Avaliar o leite de vacas através da microbiologia, quanto à presença de patógenos causadores de mastite;
- Avaliar bioquimicamente o soro do leite de vacas do período do parto até 180 dias de lactação;
- Avaliar o leite de vacas múltiparas, através de microscopia óptica, para diferenciação dos tipos celulares no decorrer do tempo de lactação;

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar as variações na contagem de células somáticas no leite e determinar a frequência de animais com mastite subclínica entre diferentes períodos de lactação;
- Identificar os patógenos presentes no leite de vacas em diferentes estágios de lactação;
- Identificar a prevalência dos patógenos durante o tempo de lactação;
- Avaliar o comportamento do cálcio, fósforo, magnésio e cloreto no decorrer do tempo de lactação e correlaciona-lo aos outros analitos testados;
- Avaliar o comportamento da gama-glutamilttransferase e da fosfatase alcalina no decorrer do tempo de lactação e entre os outros analitos testados;
- Avaliar o comportamento dos analitos: cálcio, fósforo, magnésio, cloreto, GGT, e Fosfatase

Alcalina do leite de vacas pluríparas, no decorrer do tempo de lactação e, a correlação existente entre eles e a ocorrência de mastite clínica/subclínica;

- Avaliar a concentração e a porcentagem dos neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais e basófilos no decorrer da lactação;
- Calcular o valor absoluto das células encontradas com base na Contagem de Células Somáticas;
- Correlacionar a presença das células anteriormente citadas com a concentração de gama-glutamilttransferase, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo, magnésio e cloreto, quantificação bacteriana e com a contagem de células somáticas.

5 HIPÓTESE

Vacas com mastite apresentam alterações microbiológicas, bioquímicas e celulares no leite.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Minas Gerais sob o protocolo 358/2012.

Foram coletadas amostras de leite de 25 vacas pluríparas, da raça girolando com graus de sangue da raça Holandês variando de 3/4 a 15/16, provenientes de uma fazenda comercial localizada no distrito de Ibitira, município de Martinho Campos, centro-oeste de Minas Gerais, situado a 19° 19' de latitude S e 45° 14' de longitude W e com altitude média de 674 metros acima do nível do mar no período de fevereiro de 2012 a novembro de 2012 possuindo clima se caracterizado por verão chuvoso e inverno seco.

As vacas secas permaneciam em um pasto afastado até completarem aproximadamente quatro semanas da data prevista para o parto. Posteriormente, eram conduzidas para um pasto mais próximo, no qual permaneciam em média 30 a 45 animais sem segregação de vacas e novilhas em uma área de cinco hectares formada por pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens*), com áreas de sombra natural e

sombreamento artificial (sombrites). Quando as vacas apresentavam algum sinal de proximidade do parto, como aumento de volume do úbere, relaxamento dos ligamentos do sacro ou edema de úbere ou vulvar, eram levadas para piquetes maternidade próximos às instalações da ordenha para facilitar o monitoramento pelo funcionário responsável. Estes piquetes eram monitorados constantemente entre 06:00 e 17:00 horas.

No dia do parto, o bezerro era deixado junto da vaca somente o tempo necessário para a ingestão do colostro e caso a ingestão do colostro não fosse monitorada, o mesmo era fornecido posteriormente à identificação do parto (partos noturnos). Posteriormente a vaca era transferida para a ordenha subsequente para ser ordenhada e encaminhada para o lote de vacas recém-paridas até o término da produção de colostro (4 a 5 dias). Terminando este tempo, as vacas eram transferidas para o lote de vacas pós-parto onde permaneciam por aproximadamente 30 dias, sendo posteriormente distribuídas em diferentes lotes de acordo com sua produção leiteira.

As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, sendo a primeira ordenha iniciada às 04:00 e segunda às 13:00 horas. A ordenha era mecanizada em contenção tipo espinha de peixe, sendo ordenhadas oito vacas de cada lado em sistema fechado e linha alta. Antes da ordenha de cada animal era realizado o *pré-dipping* com solução hipoclorito de sódio a 2%. No final da ordenha era feito o *pós-dipping* com solução à base de iodo. A ordem de ordenha era a seguinte: lote de vacas recém-paridas (com até 5 dias pós-parto), 1º lote (vacas de primeira cria), 2º lote (vacas pluríparas com alta produção), 3º lote (vacas de produção intermediária), 4º lote (vacas com menor produção) e 5º lote (vacas com mastite ou em tratamento).

As áreas de deslocamento dos animais entre os piquetes e a sala de ordenha variavam de acordo com o lote em que o animal se encontrava, mas a maioria delas apresentava distâncias variando entre 500 e 1500 metros. As estradas apresentavam pequenas pedras e possíveis corpos metálicos penetrantes, como arames de cerca. Em dias de chuvas essas vias ficavam muito lamacentas e escorregadias devido à textura argilosa do terreno.

Nas proximidades da sala de ordenha havia diferentes tipos de piso colocados com o intuito

de evitar quedas de animais ou facilitar a passagem de automóveis podendo, porém, lavar a traumas mecânicos nos cascos dos animais. Entre os diferentes materiais utilizados no solo havia cascalho, sobras de pedras de ardósia e áreas calçadas com paralelepípedos.

A sala de espera da ordenha era composta de piso de concreto, coberta com sombrites e apresentava microaspersores de água e ventiladores para amenizar as altas temperaturas ambientais em determinados horários e dias. Entretanto o piso da sala de espera apresentava grande acúmulo de umidade e fezes no decorrer da ordenha. Após a ordenha os animais voltavam a passar em locais com acúmulo de cascalho e pedras fazendo o caminho de volta para os piquetes.

Quanto ao manejo nutricional, durante os meses de janeiro a abril, nos quais as chuvas foram mais frequentes e, conseqüentemente, existia maior disponibilidade das pastagens, os animais consumiram pasto misto de Mombaça (*Panicum maximum*), tifton (*Cynodon*) e principalmente braquiária (*Brachiaria brizanta*) além de silagem de milho e concentrado. Nos meses de maio a agosto, os animais consumiram silagem de milho como volumoso e concentrado de acordo com a produção. Em todos os piquetes havia bebedouros e cocho de sal mineral, porém foi observado suplementação mineral ineficiente. A alimentação era fornecida na forma de dieta total sendo a ração e silagem misturadas e administradas por vagão forrageiro “Total mix” e fornecida três vezes ao dia, no período chuvoso e quatro vezes ao dia no período das secas, em cocho de cimento, muitas vezes com pequena área de cocho por animal.

Para a coleta, depois do *pré-dipping* feito pela fazenda, era realizada a limpeza dos tetos com uma gaze embebida em álcool 70%. Após este procedimento foi feito o descarte dos três primeiros jatos de leite e posterior armazenamento de 10 mL de leite de todos os quartos mamários em “pool” em tubos estéreis com tampa rosqueada devidamente identificados pelos números das vacas e data de coleta. As coletas foram realizadas no dia exato do parto sendo o colostro retirado antes da colocação dos copos coletores de leite da primeira ordenha pós-parto. Após esse procedimento, as coletas foram realizadas nos dias 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 subsequentes.

Para a realização dos testes estatísticos, a variável Contagem de Células Somáticas (CCS) foi transformada em \log_{10} para execução da Análise de Variância (ANOVA). A variável Quantificação Bacteriana (QB) foi submetida ao teste de Friedman. Foram realizadas também as Análises de Regressão e Correlação de Pearson entre as variáveis. Todos os testes foram realizados considerando 5% de margem de significância. Para a realização dos testes estatísticos do isolamento bacteriano, foi

utilizado o teste não-paramétrico de McNemar, que é utilizado para analisar frequências de amostras relacionadas, onde cada indivíduo é seu próprio controle. Os resultados dos minerais e enzimas foram avaliados estatisticamente através de Análise de Variância, regressão e Correlação de Pearson. Esses resultados ainda foram correlacionados com os todos os outros resultados como a Contagem de Células Somáticas e Quantificação Bacteriana.

CAPÍTULO I

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA E ISOLAMENTO BACTERIANO DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 100 espécies microbianas possivelmente presentes na glândula mamária, mas somente uma pequena quantidade de micro-organismos é importante para o surgimento da maioria dos casos de mastite clínica (Bier, 1984; Quinn *et al.*, 2005). Esses agentes infecciosos são responsáveis por causar resposta inflamatória da glândula mamária, aumentando o número de leucócitos de origem sanguínea no lúmen alveolar dos tetos. Esse quadro é conhecido como aumento de células somáticas no leite (Fonseca e Santos, 2000). Para diagnosticar as infecções intramamárias com alta sensibilidade, a metodologia mais utilizada é o isolamento do micro-organismo segundo Buelow *et al.* (1996). Este exame é considerado útil para o monitoramento de programas de controle de mastite, sendo que culturas negativas não necessariamente significam ausência de patógenos (Brito *et al.*, 1998).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Após a coleta do leite foram confeccionadas lâminas conforme a técnica de Prescott e Breed (1910) modificada (Benites *et al.*, 2001). Essas lâminas foram acondicionadas em recipientes próprios e levadas para o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram processadas seguindo a técnica citada anteriormente, que preconiza a distribuição de 10 µL de leite em uma área de 1 cm² em lâmina de microscopia, seguida pela secagem, remoção da gordura com xilol por 1 min., lavagem com metanol por 1 min. e utilização de panótico para coloração das lâminas (Sarikaya *et al.*, 2004). Após coloração foi realizada observação de 10 campos ópticos em objetiva de 100x, utilizando-se óleo de imersão para a Contagem das Células Somáticas do leite, conforme figura 1. As médias dos resultados

foram multiplicadas por 324.780,8, esse fator foi calculado segundo o microscópio utilizado para correção microscópica, sendo o resultado expresso em x10²/mL de leite.

A estimativa da Quantificação Bacteriana foi realizada nas mesmas lâminas onde se realizou a Contagem das Células Somáticas e diferencial celular. Para este procedimento, foram selecionados 10 campos sendo dois campos verticais na parte esquerda do conteúdo em lâmina, dois campos verticais na parte direita do conteúdo em lâmina, dois campos horizontais na parte superior medial do conteúdo em lâmina, dois campos horizontais na parte central medial do conteúdo em lâmina e dois campos horizontais na parte inferior medial do conteúdo em lâmina conforme figura 1. À observação desses campos, classificou-se de forma geral em todos os campos, em escores, de acordo com a intensidade da presença de bactérias: 1 (+), 2 (++) , 3 (+++) e 4 (++++) a fim de obter a padronização da Quantificação Bacteriana por lâmina.

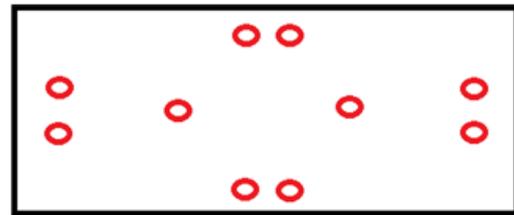


Figura 1: Ilustração dos 10 campos ópticos utilizados para realização da Contagem de Células somáticas e Quantificação Bacteriana.

Para o isolamento bacteriano, as coletas do parto, 5 e 10 dias de lactação foram realizadas para o mesmo objetivo de Buelow *et al.* (1996). Essas coletas e as posteriores serviram para montar o perfil do comportamento bacteriano no decorrer do tempo (análise longitudinal). Após a confecção das lâminas, o leite foi congelado para transporte até a Universidade Federal de Minas Gerais para realização do isolamento bacteriano, sendo o descongelado realizado apenas no dia da análise. A metodologia utilizada foi a descrita por Champoux *et al.* (1990), que preconiza o preparo de caldo *Müller Hinton*, estéril na proporção de 3 mL para cada 200 µL de leite a ser testado, incubados por oito horas a 37°C. Após oito horas, foi realizada a leitura por microscopia de campo escuro para identificação

da morfologia bacteriana. Depois da leitura, a alça de inoculação bacteriana foi segurada como uma caneta e levada ao fogo até a alça atingir o rubro. Após esfriar, a alça foi utilizada para coletar uma pequena porção do material para a cultura e essa porção foi espalhada suavemente em “zig-zag” no meio ágar-ágar preparada anteriormente de forma estéril. Após esse processo, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas.

Para a avaliação morfo-tintorial foi realizada coloração de Gram. Após a separação dos micro-organismos em gram-positivos ou gram-negativos foram feitas as provas bioquímicas. Para micro-organismos gram-positivos, foram realizadas as provas de catalase, cloreto de sódio (NaCl), hemólise da colônia, arginina, glicerol, sorbitol e manitol. Para micro-organismos gram-negativos, foram realizadas as provas de citrato, glicose, gás de glicose, ácido sulfídrico (H₂S), idol, lactose, lisina, manitol, motilidade bacteriana, ornitina, oxidase, salicina, sorbitol, sacarose, uréia e vermelho de metila, segundo – Voges e Proskauer (1898). Os patógenos bacterianos foram classificados de acordo com a chave, após os resultados bioquímicos da colônia pura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

As médias dos valores da Contagem de Células Somáticas (CCS) estão apresentadas na Tabela 1 e ilustrados nos gráficos 1 e 2. Os valores de CCS apresentaram uma diminuição do dia zero (parto) ao dia 10, no pós-parto, corroborando com os achados de Natzke *et al.* (1972), Dohoo e Meek, (1982) e Sargeant *et al.* (2001). Nos demais tempos, não houve diferença, semelhante aos achados de Barbosa *et al.* (2007).

A curva de regressão foi expressa pela equação $\text{Log CCS} = 5,820071 - 0,00923 t + 0,000045 t^2$ e está ilustrada no gráfico 2. Observa-se por esta curva que no início da lactação, a CCS se encontra elevada tendo um decréscimo entre 90 e 120 dias de lactação. Essa elevação no início da lactação é característica, onde o colostro principalmente na primeira semana, possui elevada concentração de células somáticas em virtude das necessidades dos bezerros recém-nascidos (Sargeant *et al.*, 2001), podendo esse processo se estender por duas semanas (Natzke *et al.*, 1972). A curva ainda expressa um aumento a partir dos 120 dias de lactação, fato este que corrobora com os achados de Barbosa *et al.* (2007) que observaram aumento na concentração de células somáticas no leite gradualmente, à medida em que a lactação avança do meio para o fim.

Tabela 1: Médias dos valores de Contagem de Células Somáticas (CCS) do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

GRUPO/dias	CCS	Desvio Padrão	Comparação estatística
Parto	2.131.861,17	±2.486.463,06	A
5	1.523.871,51	±3.424.319,30	AB
10	971.744,15	±1.148.079,07	B
30	891.487,21	±2.369.053,70	B
60	494.965,94	±484.391,81	B
90	726.209,87	±1.264.661,57	B
120	427.411,53	±539.132,87	B
150	328.822,52	±296.973,61	B
180	1.071.776,64	±1.987.939,74	B

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de Análise de Variância ($p < 0,05$).

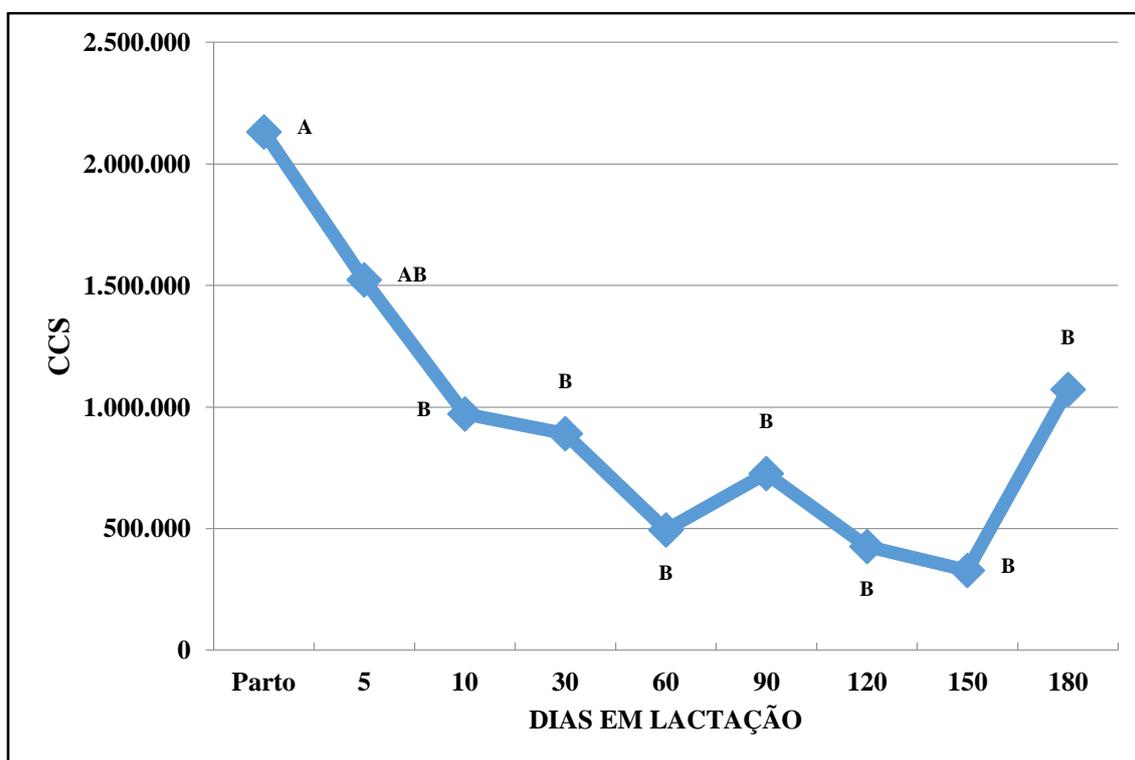


Gráfico 1: Valores médios de Contagem de Células Somáticas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de Tukey ($p < 0,05$)

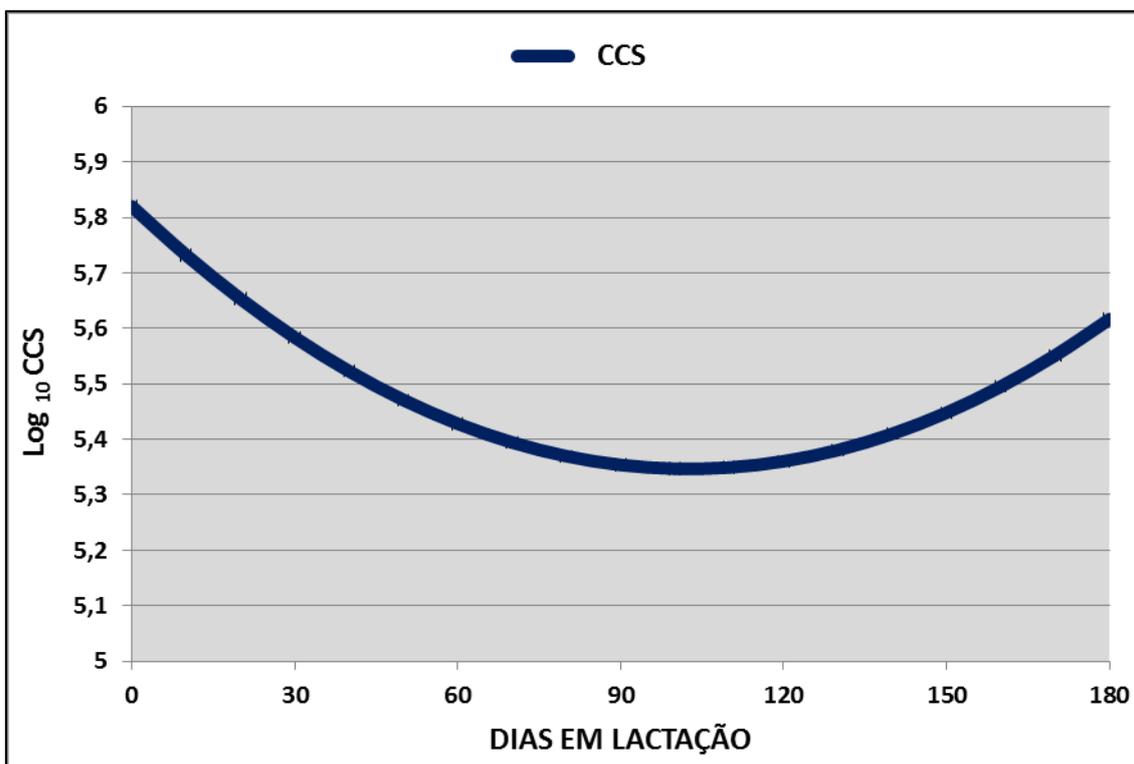


Gráfico 2: Gráfico da regressão da Contagem de Células Somáticas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia expressa pela fórmula $\text{Log CCS} = 5,820071 - 0,00923 t + 0,000045 t^2$. $P < 0,0000$ e $r^2 = 55,32\%$

3.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) EM MASTITE SUBCLÍNICA

Dohoo e Leslie (1991) e Ladeira (2001) preconizaram para vacas saudáveis, valores de contagem de células somáticas menores que 200.000 células/ml e para vacas com mastite subclínica valores maiores que 200.000 células/ml. Foi observado que em todos os tempos (Tabela 2), com exceção dos 30 e 120 dias pós-parto o número de vacas com a quantidade de células/ml de leite maior que 200.000 é maior que o número de vacas que apresentaram valores menores que a taxa de corte. Das 25 vacas, 23 (92%) apresentaram valores maiores que 200.000 células/ml de leite, no parto porém, esses valores devem ser desconsiderados para definição de casos de mastite subclínica de acordo com Dohoo e Meek (1982) que afirmam que, neste período o aumento das células somáticas ocorre devido às necessidades imunológicas do bezerro. Da mesma forma, Sargeant *et al.* (2001) e Natzke *et*

al. (1972) sugerem que contagens altas sejam desconsideradas aos cinco e 10 dias pós-parto, respectivamente.

Aos 30 e 120 dias de lactação, 13 (52%) vacas apresentaram contagens de CCS abaixo da taxa de corte, mostrando nestes tempos avaliados a diminuição de possíveis casos de mastite subclínicas, quando se considera os relatos de Ladeira (2001) que considera a taxa de corte de 200.000 células/ml para definição de mastite subclínica.

Aos 60, 90, 150 e 180 dias, observou-se o predomínio de vacas acima da taxa de corte (15 (60%), 19 (76%), 17(68%) e 18 (72%) respectivamente), sendo indicativo de quadros subclínicos da doença se considerarmos as taxas de corte segundo Ladeira (2001). Se fossem utilizados os valores individuais de cada vaca, casos agudos de mastite poderiam ser detectados, como sugeriram Paes *et al.* (2003) e Edmondson e Bramley, (2004). O gráfico 3 ilustra a distribuição da frequência supracitada no decorrer dos tempos avaliados.

Quando comparados no decorrer do tempo, observa-se que houve uma diminuição significativa da frequência de vacas com a CCS acima da taxa de corte do parto aos cinco dias de

lactação (92 e 68% respectivamente), dos 10 aos 30 dias de lactação (76 e 48% respectivamente) e dos 90 aos 120 dias de lactação (76 e 48%). Nos períodos não citados, não ocorreu diferença.

Tabela 2: Frequência (%) de Contagem de Células Somáticas inferiores e superiores à 200.000/ml de leite do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS	CCS < 200.000	CCS > 200.000	Comparação estatística
Parto	8%	92%	C
5	32%	68%	AB
10	24%	76%	BC
30	52%	48%	A
60	40%	60%	AB
90	24%	76%	BC
120	52%	48%	A
150	32%	68%	AB
180	28%	72%	ABC

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método do qui-quadrado ($p < 0,05$).

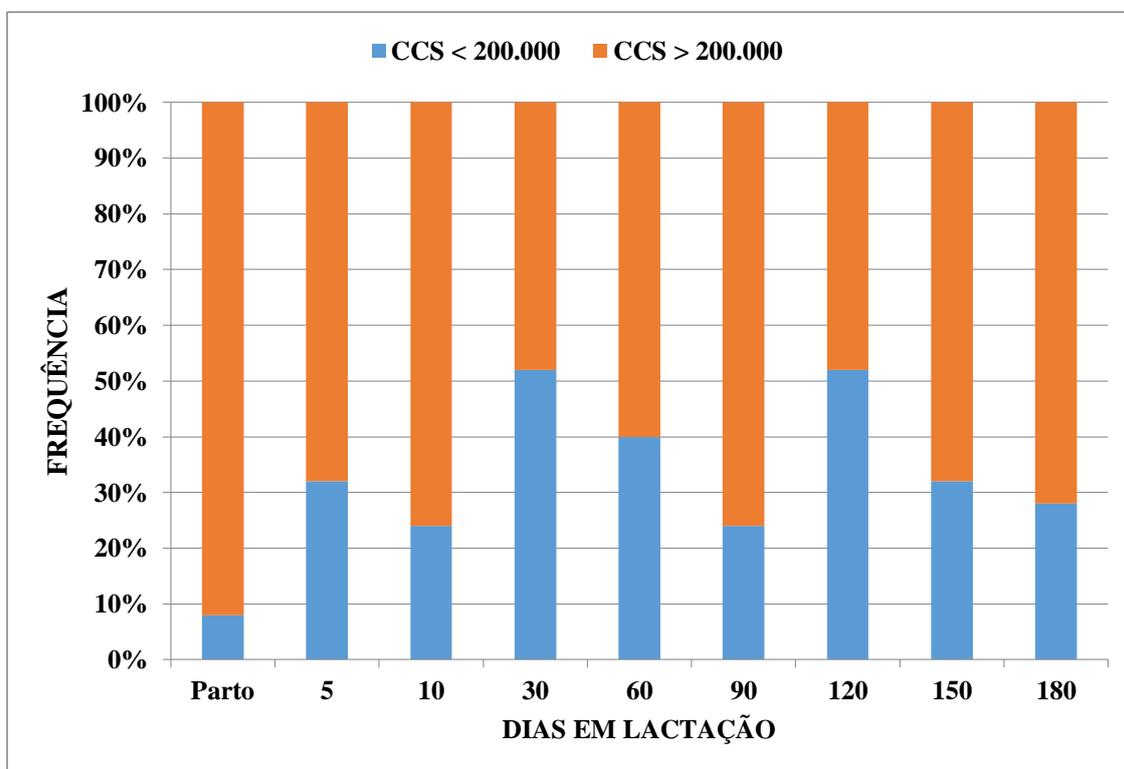


Gráfico 3: Frequência (%) da Contagem de Células Somáticas inferiores e superiores à 200.000/ml de leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

3.3 QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

A Quantificação Bacteriana (QB) foi realizada por escore objetivado padronizar a técnica, uma vez que Bueno *et al.*, (2008) e Eckstein *et al.*, (2012) mensuraram a concentração de bactérias no leite por citometria de fluxo e Blowey *et al.*, (1997) e Wallace (2008) realizaram contagem bacteriana por meio de Placas de Petri.

A QB (Tabela 3) apresentou diferença significativa entre os tempos no escore classificado como uma cruz (+) e três cruces (+++). Essa diferença ocorreu no escore de uma cruz (+) no parto quando comparado com os demais tempos. Já no escore classificado como três cruces (+++) a diferença significativa se deu aos 60 dias de lactação quando comparado aos

demais tempos. O gráfico 4 ilustra o percentual de indivíduos dentro de um determinado tempo e suas distribuições de carga bacteriana segundo o sistema de escore.

A baixa carga bacteriana encontrada no parto em que 15 (60 %) vacas apresentaram QB avaliada em (+) assemelha-se aos achados de Natzke *et al.* (1972). Houve também diferença significativa nos tempos de 60 dias no pós-parto, em que 13 (52%) dos 25 animais avaliados apresentaram carga bacteriana avaliada em (+++) e 120 dias no pós-parto em que 12 (48%) dos 25 animais avaliados apresentaram carga bacteriana avaliada em (++). Esses achados também corroboram com os de Natzke *et al.*, (1972), uma vez que no decorrer da lactação há diminuição das infecções e consequentemente da carga bacteriana presente como no trabalho do autor supracitado.

Tabela 3: Frequência (%) por escore da Quantificação Bacteriana do parto (dia zero) até 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, sendo (+) para vacas com pouca carga bacteriana e (++++) para vacas com alta carga bacteriana

CBT				
DIAS	(+)	(++)	(+++)	(++++)
Parto	60% ^a	24% ^a	12% ^b	4% ^a
5	20% ^b	24% ^a	32% ^b	24% ^a
10	20% ^b	36% ^a	24% ^b	20% ^a
30	24% ^b	24% ^a	28% ^b	24% ^a
60	12% ^b	16% ^a	52% ^a	20% ^a
90	8% ^b	40% ^a	20% ^b	32% ^a
120	20% ^b	48% ^a	16% ^b	16% ^a
150	12% ^b	40% ^a	32% ^b	16% ^a
180	28% ^b	24% ^a	20% ^b	28% ^a

Letras diferentes representam diferença significativa segundo Teste do Qui-Quadrado (p<0,05).

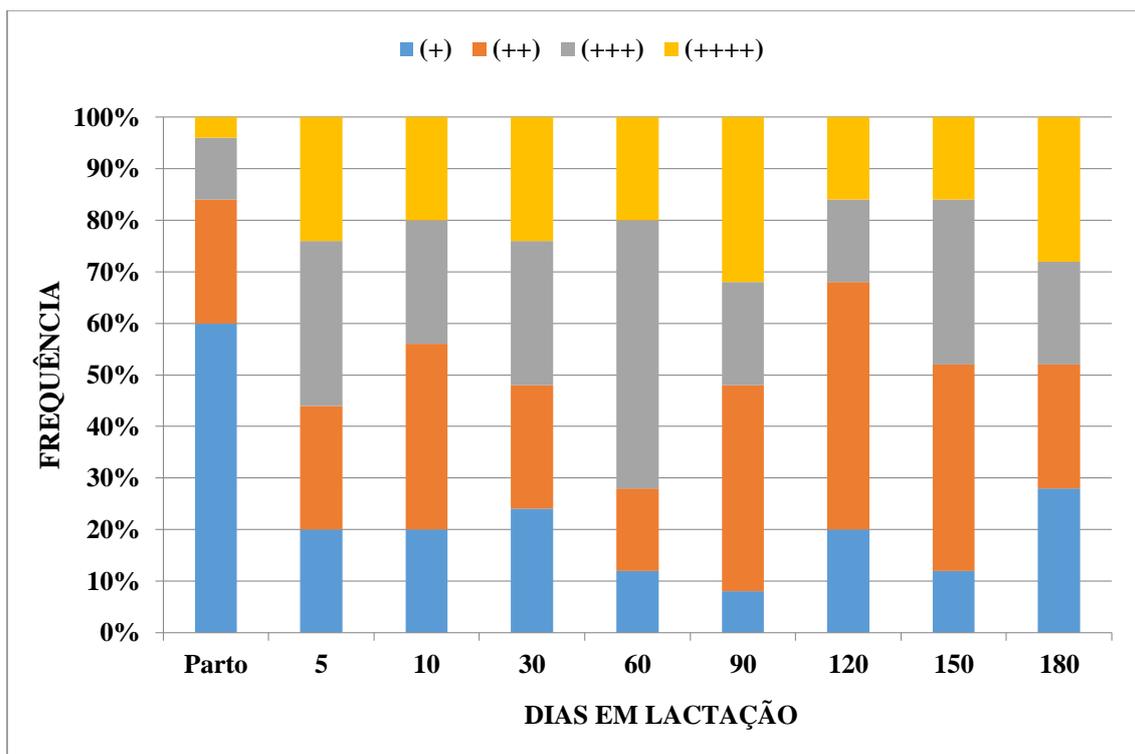


Gráfico 4: Distribuição de frequência do escore de Quantificação Bacteriana do leite de 25 vacas girolandas pluríparas no parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

3.4 CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

Houve correlação negativa entre a Contagem de Células Somáticas e Quantificação Bacteriana ($r^2 = -0,27$). Isso quer dizer que à medida que aumentou a quantidade de células somáticas presentes no leite, diminuiu a quantidade de bactérias presentes no mesmo. Essa correlação é explicada pela função fagocitária das células sanguíneas presentes no leite (Stockhan e Scott, 2011).

3.5 ISOLAMENTO DE PATÓGENOS

Na avaliação da frequência dos patógenos no decorrer dos tempos avaliados os agentes bacterianos encontrados foram classificados na ordem de maior para menor frequência. No parto, foram encontrados o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* sp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp.. Aos 5 dias de lactação, foram

encontrados os agentes bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp.. Aos 10 dias de lactação, os agentes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus* sp.. Aos 30 dias de lactação, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus uberis*, *Enterobacter* sp., *Staphylococcus epidermidis*, e *Escherichia coli*. Aos 60 dias, os patógenos encontrados pela cultura bacteriana do leite foram *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus epidermidis*. Aos 90 dias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus epidermidis*. Aos 120 dias de lactação, foram encontrados *Enterobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus haemolyticus*. Aos 150 dias, *Enterobacter* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Bacillus*

sp. e aos 180 dias de lactação foram encontrados os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp..

No isolamento, as tabelas 4, 6, 8 e 10 mostram a frequência e diferenças estatísticas observadas no período inicial do experimento (10 dias de

lactação). Nas tabelas 5, 7, 9 e 11, encontram-se os mesmos patógenos, frequência e diferenças estatísticas dos 30 aos 180 dias de lactação. Essa divisão foi realizada segundo Buelow *et al.* (1996) para confirmação da positividade da vaca para o patógeno *S. aureus* nas três primeiras coletas.

Tabela 4: Frequência, seguida da prevalência de *Staphylococcus aureus* no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS CONTAGIOSOS			
PÁTOGENO	PARTO	5 DIAS	10 DIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	14 (56%) ^a	9 (36%) ^a	10 (40%) ^a

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar (p<0,05).

Tabela 5: Frequência, seguida da prevalência de *Staphylococcus aureus* aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS CONTAGIOSOS						
PÁTOGENO	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS	150 DIAS	180 DIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	7(28%) ^b	4(16%) ^{dh}	8(32%) ^a	6(24%) ^{fg}	4(16%) ^{eh}	6(24%) ^{fg}

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar (p<0,05).

Das 25 vacas analisadas, 18 (72%) apresentaram *S. aureus* em pelo menos um dos três primeiros períodos analisados. Isso mostra a alta prevalência do patógeno do rebanho em questão. Essa prevalência encontrada nas três primeiras coletas (Tabela 4) e no decorrer da lactação foi a maior quando comparada com outros patógenos encontrados, corroborando os achados de Ferreira *et al.* (1981), Laranja e Machado (1994), Tenhagen *et al.* (2006), Benhamed *et al.* (2011), Junaidu *et al.* (2011), Moges *et al.* (2011) e Yuan-Yuan *et al.* (2012). A frequência das vacas positivas para *S.aureus* no dia do parto foi de 56% e não houve aumento da mesma até aos 10 dias de lactação. A partir dos 30 dias de lactação (Tabela 5), a frequência de vacas positivas foi oscilante, encontrada no dia 90 a maior frequência e as menores aos 60 e 150 dias. Não houve diferença entre os 60 e 150 dias pós-parto

e 120 e 180 dias pós-parto. Esses achados mostram o comportamento cíclico descrito por Quinn *et al.* (2005) e Latasa *et al.* (2006).

No dia do parto, o principal agente ambiental identificado foi o *S. uberis* (Tab. 6), presente em 44% das amostras. Sua frequência diminuiu aos 10 dias de lactação. A partir dos 30 dias (Tab. 7), sua frequência diminuiu rapidamente até aos 90 dias de lactação. A partir dos 120 dias até aos 180, este micro-organismo não foi mais diagnosticado. A elevada frequência desse patógeno no início da lactação está de acordo com os achados de Kenny *et al.* (2004). A partir dos 120 dias de lactação, o patógeno não foi mais encontrado nas amostras coletadas. A alta prevalência do *Streptococcus uberis*, perdendo apenas para o *S. aureus* foi semelhante ao encontrado por Tenhagen *et al.* (2006).

Tabela 6: Frequência, seguida da prevalência de *Streptococcus* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS AMBIENTAIS			
PÁTÓGENOS	PARTO	5 DIAS	10 DIAS
<i>Streptococcus</i> spp.	0*	0*	1 (4%) ^a
<i>Streptococcus uberis</i>	11 (44%) ^{ab}	9 (36%) ^a	4 (16%) ^b
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0*	0*	0*
<i>Pseudomonas</i> spp.	0*	1 (4%) ^a	0*
<i>Bacillus</i> spp.	2 (8%) ^b	1 (4%) ^c	4 (20%) ^a

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar ($p < 0,05$).

Tabela 7: Frequência, seguida da prevalência de *Streptococcus* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS AMBIENTAIS						
PÁTÓGENOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS	150 DIAS	180 DIAS
<i>Streptococcus</i> spp.	0*	0*	0*	0*	0*	0*
<i>Streptococcus uberis</i>	5(20%) ^a	3(12%) ^b	1(4%) ^c	0*	0*	0*
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0*	0*	0*	6(24%) ^b	5(20%) ^{ac}	5(20%) ^{ad}
<i>Pseudomonas</i> spp.	0*	0*	0*	0*	0*	0*
<i>Bacillus</i> spp.	6(24%) ^a	6(24%) ^a	2(8%) ^b	0*	1(4%) ^c	2(8%) ^{bd}

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar ($p < 0,05$).

Streptococcus dysgalactiae (Tabela 6) somente foi isolado a partir de 120 dias de lactação e estava presente em cerca de 20% dos animais até os 180 de lactação (Tabela 7).

O *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. (Tab. 6 e 7) e *Proteus* spp. (Tab. 8 e 9) foram observados apenas no período inicial da lactação e em frequência baixa. Isto pode ser explicado devido à imussupressão do animal no período do periparto como descreveram Mulligan e Doherty (2008). Em estudos avaliados neste trabalho, o isolamento positivo de *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas*, deveu-se à contaminação ambiental (Quinn *et al.*, 2005), enquanto que quando *Proteus* spp. foi isolado havia contaminação da cama, solo, e água (Hogan, *et al.*, 1990). As condições citadas acima são as mesmas que ocorreram na fazenda onde este experimento foi realizado, contribuindo assim

para contaminação por esses patógenos. Ainda assim, o fato desses micro-organismos terem sido identificados em cultura somente no período inicial da lactação, não provou que as culturas negativas posteriores significassem a ausência de patógenos como descreveu Brito *et al.* (1998). Cabe ressaltar ainda que, não foram encontrados estudos que mostrem o comportamento desses micro-organismos no decorrer da lactação.

O isolamento para *Bacillus* spp. apresentou diferença significativa nas três primeiras coletas (Tab. 6). Houve redução significativa aos cinco dias em relação ao parto e posterior aumento aos dez dias de lactação. No decorrer da lactação (Tab. 7), não houve diferença entre os valores encontrados aos 30 e 60 dias de lactação. Nos períodos de 90 e 150 dias de lactação, ocorreu diminuição significativa, tendo aumento significativo aos 180 dias de lactação.

Tabela 8: Frequência, seguida da prevalência de *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS AMBIENTAIS - COLIFORMES			
PÁTÓGENOS	PARTO	5 DIAS	10 DIAS
<i>Escherichia coli</i>	2 (8%) ^b	4 (16%) ^a	4(16%) ^a
<i>Proteus</i> spp.	0*	1 (4%) ^a	0*
<i>Enterobacter</i>	1 (4%) ^a	0*	0*

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar ($p < 0,05$).

Tabela 9: Frequência, seguida da prevalência de *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS AMBIENTAIS - COLIFORMES						
PÁTÓGENOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS	150 DIAS	180 DIAS
<i>Escherichia coli</i>	2(8%) ^b	0*	3(12%) ^a	0*	0*	0*
<i>Proteus</i> spp.	0*	0*	0*	0*	0*	0*
<i>Enterobacter</i>	3(12%) ^c	2(8%) ^d	2(8%) ^d	7(32%) ^a	5(20%) ^b	3(12%) ^c

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar ($p < 0,05$).

A *Escherichia coli* (Tabela 8) por sua vez foi isolada no parto em 8% das vacas, apresentando aumento significativo aos cinco dias de lactação e se mantendo constante aos 10 dias. Isso corrobora com Radostits *et al.* (2000), que afirmaram que as infecções ocorrem com maior intensidade nas primeiras semanas de lactação. No decorrer da lactação (Tabela 9) houve aumento significativo aos 30 e aos 90 dias de lactação. Dos 60 aos 180 dias de lactação, o patógeno não se mostrou presente nas culturas realizadas. Segundo Todhunter *et al.* (1991), ocorre maior incidência de *E. coli* no verão. Como o período dos 60 aos 180 dias de lactação deste experimento coincidiu com o período de outono, inverno e início de primavera, é possível que este fato tenha contribuído para o não crescimento deste patógeno em cultura. Isso não quer dizer que esse patógeno não esteve presente e nem atuou como agente contaminante, pois

mesmo tendo como resultado negativo da cultura bacteriana, o patógeno pode ter sido causador de infecção nesse período, não tendo sido detectado.

O *Enterobacter* (Tabela 8) foi encontrado nas culturas bacterianas das três primeiras amostras, somente no período do parto. No decorrer do experimento (Tab. 9), o patógeno foi encontrado nas culturas bacterianas a partir dos 30 dias de lactação em diante com redução significativa aos 60 dias de lactação, se mantendo constante aos 90 dias. Aos 120 dias de lactação apresentou aumento significativo. Aos 150 e 180 dias de lactação foi observado diminuição da prevalência desse patógeno no leite. O comportamento do *Enterobacter* no decorrer do tempo pode ser explicado pela presença de cápsula, o que facilita sua sobrevivência intracelular (Quinn *et al.*, 2005).

Tabela 10: Frequência, seguida da prevalência de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* no dia do parto, com 5 e 10 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS COAGULASE-NEGATIVOS			
PÁTÓGENOS	PARTO	5 DIAS	10 DIAS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 (12%) ^c	4 (16%) ^b	5 (20%) ^a
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0*	0*	0*

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar (p<0,05).

Tabela 11: Frequência, seguida da prevalência de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de lactação de 25 vacas girolandas pluríparas em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

PATÓGENOS COAGULASE-NEGATIVOS						
PÁTÓGENOS	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 DIAS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2(8%) ^b	3(12%) ^a	1(4%) ^c	0*	0*	0*
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0*	0*	0*	4(16%) ^b	3(12%) ^c	5(20%) ^a

Letras diferentes representam diferença significativa segundo método de McNemar (p<0,05).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* vem ganhando importância em um cenário onde na maioria das vezes se sobressai o *Staphylococcus aureus* como patógeno mais prevalente (Andrade *et al.*, 1998 e Oliveira *et al.*, 2011). No presente estudo esse fato não foi verificado, sendo ainda o *S. aureus* o patógeno de maior prevalência no rebanho estudado.

O *Staphylococcus Epidermidis* (Tabela 10) apresentou alta prevalência, aos 5 e 10 dias de lactação. Foi observado aumento significativo (Tab. 11) aos 60 dias de lactação e redução aos 90 dias de lactação. Aos 120, 150 e 180 dias de lactação o patógeno não foi observado nas culturas bacterianas. Não foram encontrados estudos demonstrando o porquê que este patógeno não se fez presente no terço-médio da lactação. Não se sabe se essa ausência é devido ao tempo de lactação ou às estações do ano, mas, não quer dizer que, por não ter sido detectado à cultura, esse patógeno não estivesse presente. Problemas de manejo (Thorberg *et al.*, 2009), muito comuns na fazenda onde foi realizado esse experimento podem ter contribuído para o aparecimento de *S. Epidermidis*.

O *Staphylococcus haemolyticus* (Tabela 10) foi encontrado a partir dos 120 dias de lactação tendo uma redução significativa aos 150 dias e

aumento aos 180 dias de lactação (Tabela 11). Como não se trata de um micro-organismo tão patogênico quanto o *S. aureus* e que vem ganhando importância na produção de leite recentemente, não foram encontrados estudos que mostrem o comportamento desse patógeno no decorrer da lactação.

4 CONCLUSÕES

- O colostro apresenta maior contagem de células somáticas e menor quantificação bacteriana do que o leite produzido a partir dos 5 e dez dias respectivamente;
- O leite de vacas com maior contagem de células somáticas apresentou menor quantidade de bactérias;
- A frequência de vacas com mastite subclínica é alta na propriedade estudada e foi maior aos 10, 90 e 180 dias pós-parto;
- A frequência de animais com alta quantificação bacteriana foi maior aos 60 dias de lactação;
- Houve alta prevalência de *Staphylococcus aureus* e de *Streptococcus uberis* nas amostras colhidas no dia do parto;

- Os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Bacillus* spp. foram os patógenos mais prevalentes;
- O *Staphylococcus aureus* se mostrou presente do parto aos 180 dias de lactação, com frequência alta no meio da lactação e moderada dos 30 aos 180 dias de lactação;
- O *Streptococcus dysgalactiae* e o *Staphylococcus haemolyticus* foram encontrados somente a partir do meio da lactação.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO DE LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os minerais são elementos inorgânicos constituintes dos ossos, dentes e responsáveis pela manutenção e regulação da pressão osmótica, do equilíbrio ácido-básico, componente ativador de numerosos sistemas enzimáticos ou hormonais. São classificados como macro e microminerais sendo os macrominerais exigidos em maiores concentrações pelo organismo animal. Dentre os macrominerais destacam-se o Cálcio, Fósforo, Magnésio e Cloro (Ferreira *et al.*, 2004).

Enzimas são proteínas responsáveis pela catalisação de reações químicas (Stockhan e Scott, 2011). O leite bovino contém aproximadamente 32 g/L de proteínas sendo que somente 1-2 g/L são proteínas transferidas do sangue (Andrews e Alichanidis, 1983). A distribuição de enzimas no leite não ocorre de forma homogênea, A Gama-glutamyltransferase (GGT) e a Fosfatase Alcalina (ALP) dentre outras, são encontradas principalmente no soro do leite (Kitchen *et al.*, 1970). Alguns fatores podem influenciar a atividade enzimática no leite, dentre eles a alimentação, a idade, número de lactações, dieta, estágio de lactação e presença de mastite (Chandan *et al.*, 1968).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Após a coleta do leite, para a obtenção do soro lácteo, foi utilizada a técnica preconizada por Jain (1986) e descrita por Sant'ana *et al.* (2004) e Baroza, (2007). Após o descongelamento para o isolamento bacteriano, as amostras coletadas foram mantidas à temperatura ambiente e em seguida foi adicionado quimosina na proporção de 1µL para 1mL de leite. Após descanso de meia hora, os coalhos foram quebrados com o auxílio de ponteira descartável de pipeta e as amostras foram centrifugadas para obtenção do soro à 4.000 rpm por 20 minutos em macrocentrífuga

Centribio 80-2B®. O processamento das amostras foi realizado no analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Ontsouka *et al.*, 2003), com utilização de kits bioquímicos Synermed®. Foram mensurados os analitos: gama-glutamyl transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), cálcio, fósforo, magnésio e cloreto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CÁLCIO

A tabela 1 mostra as médias da concentração de cálcio no soro do leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 1 ilustra o comportamento da concentração de cálcio através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. Essa curva, que possui função cúbica, indicou que a concentração de cálcio no soro do leite diminuiu acentuadamente até os 60 dias de lactação, em seguida, ocorreu ligeiro aumento até os 140 dias de lactação passando a apresentar nova redução de concentração até aos 180 dias de lactação.

Ainda de acordo com a tabela 1, a concentração de cálcio no soro do leite no momento do parto apresentou-se elevada quando comparada aos demais tempos, que apresentaram diferença estatística somente entre 5 e 120 dias de lactação.

O valor da concentração de cálcio encontrado no meio da lactação (aproximadamente 150 dias) neste trabalho foi 33,47 mg/dL. Esse valor veio de encontro ao valor encontrado por Cerbulis e Farrel Jr. (1975). Esses autores acharam o valor de 1,21 g/L ou 121 mg/dL quando convertido para a unidade utilizada neste experimento.

A média geral da concentração de cálcio no soro do leite deste trabalho foi de 35,99 mg/dL, o que se encontra muito abaixo dos valores encontrados por Rodríguez *et al.* (2001), que encontraram média da concentração de cálcio no leite de 165,3mg/dL e por Ceballos *et al.* (2009), que acharam o valor de 113,58mg/dL.

Os valores encontrados de cálcio no soro do leite no dia do parto (51,10 mg/dL), com 5 dias (38,54

mg/dL), 30 dias (33,02 mg/dL), 60 dias (33,16mg/dL) e 90 dias de lactação (34,99 mg/dL) foram menores quando comparados com os valores obtidos por Tsioulpas *et al.* (2007) que encontraram 217,23 mg/dL, 145,09 mg/dL, 121,44 mg/dL, 113,43 mg/dL e 114,51 mg/dL, respectivamente. Também permaneceu diminuído quando comparado o colostro e 5 dias de lactação com os valores de El-Fattah *et al.* (2012), que encontraram valores de 281,40 mg/dL no parto e 115,20 mg/dL aos 5 dias de lactação.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que mensurem a concentração de cálcio no decorrer da lactação. A metodologia utilizada neste experimento para a mensuração da concentração de cálcio foi diferente das metodologias dos autores acima citados, isso pode explicar a diferença dos valores encontrados para os valores relatados por esses mesmos autores. Além disso, a maioria dos autores não especificam o tempo de lactação ou até mesmo a alimentação dessas vacas, o que pode alterar significativamente a concentração de cálcio no leite segundo Tamime, (2009).

Tabela 1: Médias da concentração de cálcio (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	CÁLCIO	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
0	51,10	± 21,26	A
5	38,54	± 10,47	B
10	34,15	± 10,49	BC
30	33,02	± 5,01	BC
60	33,16	± 5,00	BC
90	34,99	± 5,08	BC
120	32,00	± 5,71	C
150	33,47	± 5,51	BC
180	33,49	± 6,87	BC

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

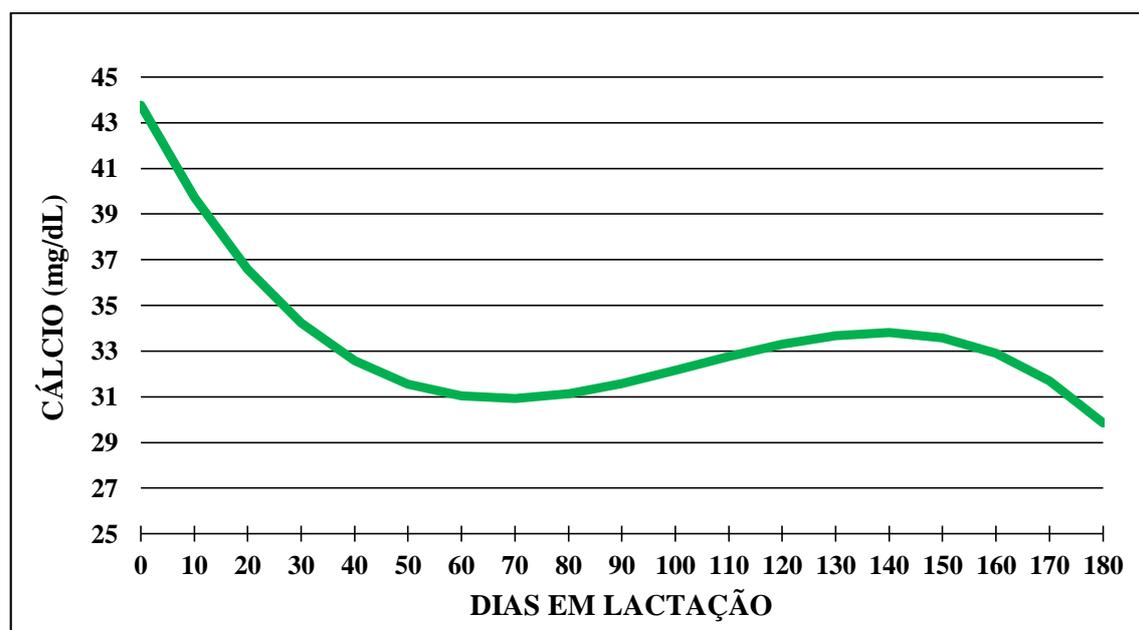


Gráfico 1: Gráfico da regressão da concentração de cálcio no soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $43,76927 - 0,452641 d + 0,004965 d^2 - 0,000016 d^3$ $P < 0,0014$ e $R^2 = 58,73\%$

3.2 FÓSFORO

A tabela 2 mostra as médias da concentração de fósforo no leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 2 ilustra o comportamento da concentração de fósforo através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. Essa curva, que possui função linear, mostrou que a concentração do fósforo aumenta no soro do leite no decorrer do tempo de lactação.

Ainda de acordo com a tabela 2, a concentração de fósforo no soro do leite no momento do parto apresentou-se elevada quando comparada aos 5 dias de lactação. Também houve diferença significativa quando comparou-se o valor da concentração de fósforo no parto com a concentração de fósforo aos 5 e 10 dias de lactação.

O valor da concentração de fósforo encontrado no meio da lactação (aproximadamente 150 dias) neste trabalho foi 35,63 mg/dL. Esse valor ficou abaixo do valor encontrado por Cerbulis e Farrel Jr., (1975). Esses autores acharam o valor de 0,985 g/L ou 98,5 mg/dL quando convertido para a unidade utilizada neste experimento. A média geral da concentração de fósforo no leite deste trabalho é de 32,09 mg/dL, o que se encontra abaixo do valor encontrado por Ceballos *et al.* (2009), que acharam o valor de 87,04 mg/dL de fósforo no leite.

Os valores encontrados de fósforo no soro do leite no período do parto (35,84 mg/dL), 5 dias

de lactação (24,04 mg/dL), 30 dias de lactação (30,13 mg/dL), 60 dias de lactação (30,17 mg/dL) e 90 dias de lactação (36,11 mg/dL) foram menores quando comparados com os valores de Tsioulpas *et al.* (2007) que encontraram para o parto o valor de 163,97 mg/dL, 100 mg/dL, 77,95 mg/dL, 71,42 mg/dL 85,09 mg/dL, respectivamente. Também permaneceu diminuído quando comparado o colostro e 5 dias de lactação com os valores de El-Fattah *et al.* (2012), que encontraram valores de 53,00 mg/dL no parto e 55,50 mg/dL aos 5 dias de lactação.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que mensurem a concentração de fósforo no decorrer da lactação. A metodologia utilizada para dosagem da concentração de fósforo neste experimento foi diferente das metodologias dos autores supracitados, isso pode explicar a diferença dos valores encontrados para os valores relatados por esses mesmos autores. Além disso, a maioria dos autores não especificaram o número de lactações. Neste caso, o valor da concentração de fósforo em vacas primíparas aumenta significativamente quando comparado às outras lactações segundo Forar *et al.* (1982). Ainda segundo esse autor, a concentração de fósforo pode variar devido ao mês do parto e produção leiteira. O tempo de lactação ou até mesmo a alimentação dessas vacas, podem alterar significativamente a concentração de cálcio no leite segundo Tamime, (2009).

Tabela 2: Médias da concentração de fósforo (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	FÓSFORO	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
Parto	35,84	± 20,30	A
5	24,04	± 6,00	C
10	25,59	± 6,05	BC
30	30,13	± ± 6,08	AB
60	30,17	± 5,70	AB
90	36,11	± 5,03	A
120	37,45	± 9,72	A
150	35,63	± 4,93	A
180	33,91	± 9,74	A

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

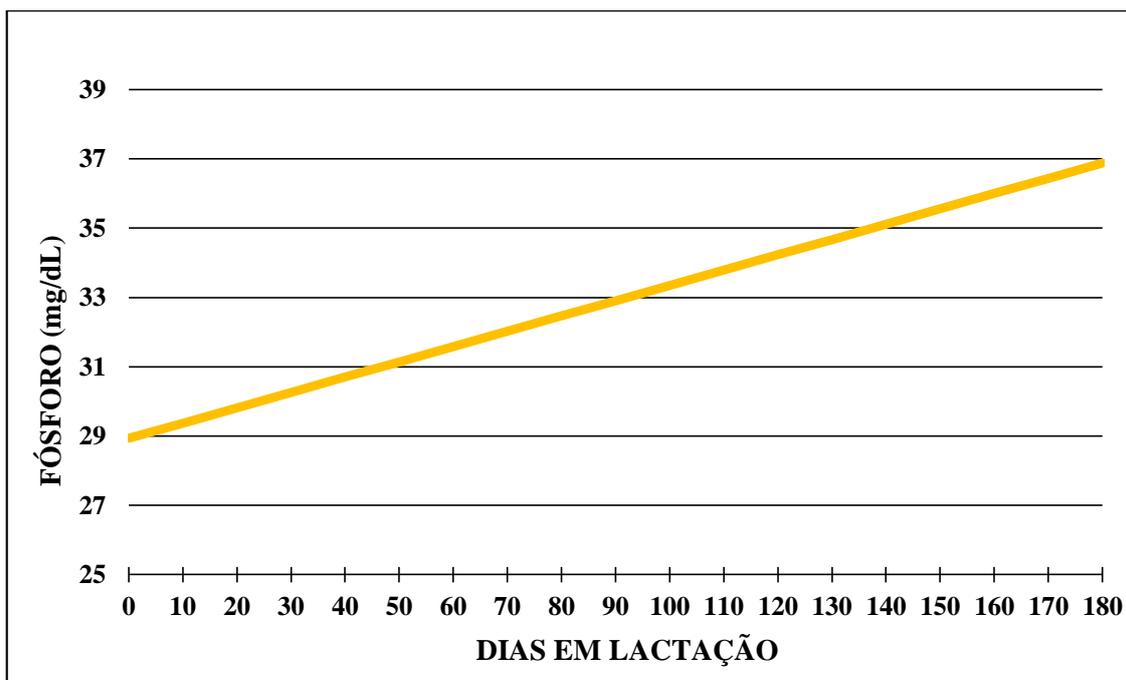


Gráfico 2: Gráfico da regressão da concentração de fósforo no soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma de fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $28,934608 + 0,044138 d$. $P < 0,05$ e $R^2 = 36,83\%$

3.3 MAGNÉSIO

A tabela 3 mostra as médias da concentração de magnésio no soro do leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 3 ilustra o comportamento da concentração de magnésio através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. Essa curva apresentou função cúbica e mostrou que, do parto aos 60 dias de lactação houve redução da concentração de magnésio. A partir dos 60 dias houve aumento moderado da concentração até aos 150 dias voltado a reduzir até aos 180 dias.

Ainda de acordo com a tabela 3, a concentração de magnésio no soro do leite no momento do parto apresentou-se significativamente elevada quando comparada ao restante dos tempos de lactação. No decorrer dos 5 dias de lactação aos 180 dias de lactação, os valores mantiveram-se constantes.

O valor da concentração de magnésio encontrado no meio da lactação (aproximadamente 150 dias) neste trabalho foi 10,18 mg/dL. Esse valor ficou próximo, porém menor quando comparado ao valor encontrado por Cerbulis e Farrel Jr.,

(1975). Esses autores acharam o valor de 0,120 g/L ou 12 mg/dL quando convertido para a unidade utilizada neste experimento.

A média geral da concentração de magnésio no soro do leite deste trabalho foi de 11,07 mg/dL, o que é praticamente semelhante ao valor encontrado por Rodríguez *et al.* (2001), que encontraram média da concentração de magnésio no leite de 11,39 mg/dL e ligeiramente aumentado quando comparado com o trabalho de Ceballos *et al.* (2009), que acharam o valor de 9,40 mg/dL de magnésio no leite.

Os valores encontrados de magnésio no leite no período do parto (26,66 mg/dL), 5 dias de lactação (8,77 mg/dL), 30 dias de lactação (9,09 mg/dL), 60 dias de lactação (9,66 mg/dL) e 90 dias de lactação (9,62 mg/dL) são ligeiramente menores quando comparados com os valores de Tsioulpas *et al.* (2007) que encontraram para o parto o valor de 29,41 mg/dL, para os 5 dias de lactação o valor de 14,34 mg/dL, para os 30 dias de lactação o valor de 12,63 mg/dL, para os 60 dias o valor de 11,42 mg/dL e para os 90 dias de lactação o valor de 10,69 mg/dL. Também permaneceu diminuído quando comparado o

colostro e 5 dias de lactação com os valores de El-Fattah *et al.* (2012), que encontraram valores de 42,86 mg/dL no parto e 14,35 mg/dL aos 5 dias de lactação.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que mensurem a concentração de magnésio no decorrer da lactação. Assim, qualquer comparação deve ser realizada com cuidado. A metodologia utilizada para dosagem da concentração de magnésio neste experimento foi

diferente das metodologias dos autores supracitados e essa diferença pode explicar a variação dos valores encontrados para os valores relatados pelos autores. Sabe-se que a concentração de magnésio no leite não é afetada pela ingestão na dieta (Hunt e Nielsen, 2009), assim sendo, não foram encontrados trabalhos referentes às outras possíveis formas de alteração da concentração de magnésio no leite no decorrer da lactação, como raças, espécies, tempo de lactação, quantidade de leite produzida.

Tabela 3: Médias da concentração de magnésio (mg/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	MAGNÉSIO	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
Parto	26,66	± 12,80	A
5	8,77	± 1,60	B
10	8,92	± 1,78	B
30	9,09	± 1,17	B
60	9,66	± 1,26	B
90	9,62	± 1,21	B
120	9,51	± 1,44	B
150	10,18	± 1,24	B
180	10,22	± 1,61	B

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

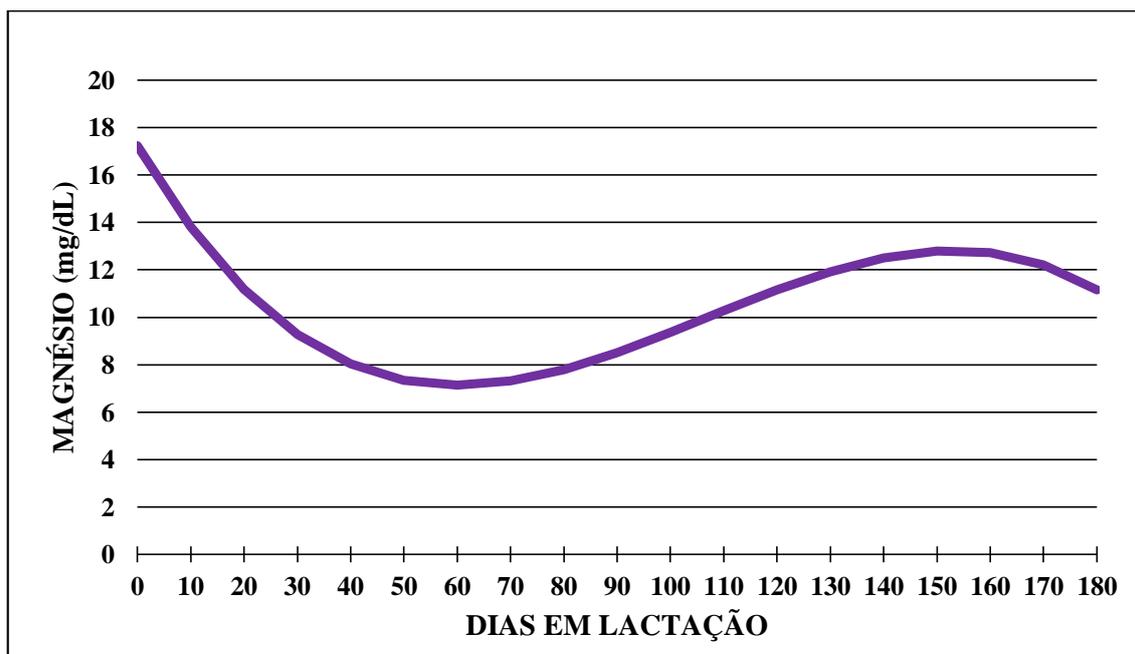


Gráfico 3: Gráfico da regressão da concentração de magnésio no soro do leite (n= 25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $17,231963 - 0,386873 d + 0,004482 d^2 - 0,000014 d^3$ com $P < 0,05$ e $R^2 = 35,68\%$

3.4 CLORETOS

A tabela 4 mostra as médias da concentração de cloreto no soro do leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 4 ilustra o comportamento da concentração de cloreto através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. A curva que gerou o gráfico 4 é de função cúbica e indica que houve redução moderada da concentração de cloretos do parto até aos 80 dias de lactação. Dos 80 aos 120 dias, a concentração permaneceu constante vindo a sofrer redução a partir dos 130 dias de lactação.

Ainda de acordo com a tabela 4 a concentração de cloreto no soro do leite no momento do parto apresentou-se elevada quando comparada ao restante dos tempos de lactação. Houve redução significativa aos 5 dias de lactação, aos 30 dias de lactação e aos 150 dias de lactação. Até o período que foi avaliado, esses achados corroboraram com os achados de Kirchgessner *et al.*, (1967) e Holt, (1993).

A concentração de cloreto foi mensurada através do “pool” dos quatro tetos, não havendo diferenciação entre eles. Dessa forma, a média geral a concentração de cloreto no leite em todos os tempos foi de 43,50 mEq/L. Não há como comparar com a metodologia realizada por Bruckmaier *et al.* (2004), que determinaram que a concentração de cloreto de quartos infectados varia entre 41-45 mEq/L.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que mensurem a concentração de cloreto no decorrer da lactação. Assim, qualquer comparação deve ser realizada com cuidado. A metodologia utilizada para dosagem da concentração de cloreto neste experimento foi diferente da metodologia do autor supracitado e essa diferença pode explicar a variação dos valores encontrados para os valores relatados pelo autor.

Tabela 4: Médias da concentração de cloreto (mEq/dL) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	CLORETO	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
0	56,58	± 16,42	A
5	49,01	± 11,08	B
10	42,84	± 8,67	C
30	43,09	± 9,40	C
60	40,98	± 12,05	CD
90	42,01	± 11,78	CD
120	41,02	± 9,98	CD
150	36,66	± 7,83	D
180	39,34	± 10,61	CD

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

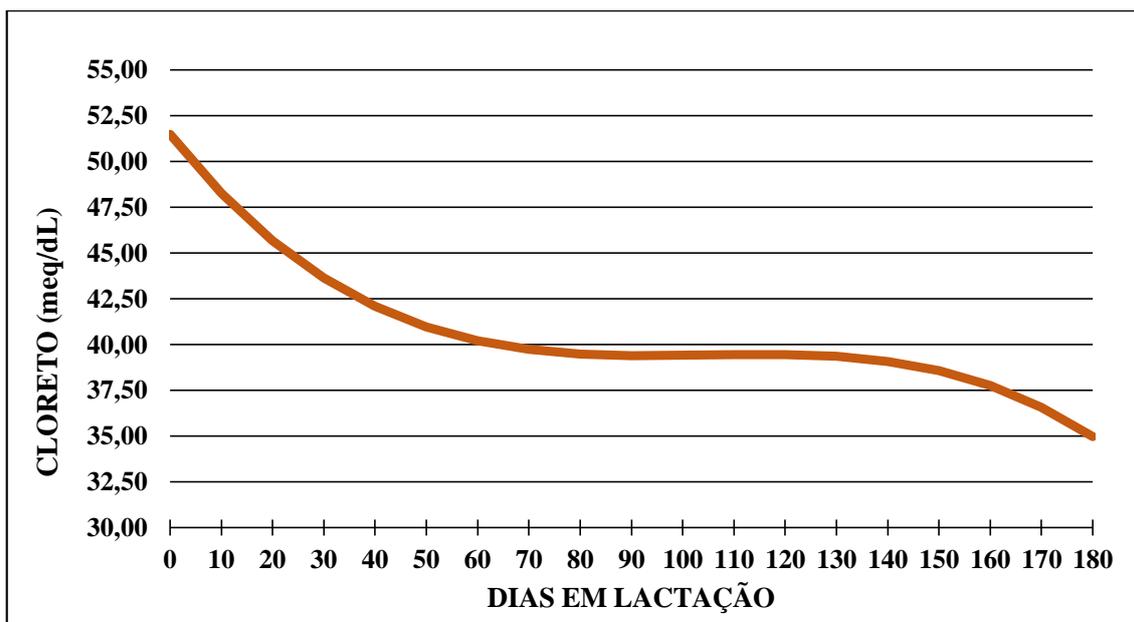


Gráfico 4: Gráfico da regressão da concentração de cloreto no soro do leite (n= 25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $51,474532 - 0,354726 d + 0,003441 d^2 - 0,000011 d^3$ $P < 0,0183$ $R^2 = 72,43\%$

3.5 FOSFATASE ALCALINA

A tabela 5 mostra as médias da concentração de fosfatase alcalina no soro do leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 5 ilustra o comportamento da concentração de fosfatase alcalina no leite através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. A curva que deu origem ao gráfico 5 é de função cúbica e indica que a concentração de fosfatase alcalina reduziu consideravelmente do parto aos 70 dias de lactação, sendo neste período o de menor concentração deste analito. Dos 80 dias até aos 150 dias de lactação, a concentração apresentou aumento discreto passando a reduzir novamente a concentração até aos 180 dias de lactação.

Ainda de acordo com a tabela 5 a concentração de Fosfatase Alcalina no parto, aos 5 dias de lactação e aos 10 dias de lactação foram semelhantes apresentando diminuição significativa aos 30 dias de lactação e elevação

significativa aos 90 dias de lactação, aos 120 dias de lactação e aos 180 dias de lactação.

O alto nível de Fosfatase alcalina na fase colostrar (parto a dez dias de lactação) deste trabalho corrobora com os estudos realizados por Kiermeier e Meinl (1961), porém até a metade da lactação, o valor da ALP aumentou significativamente diferindo também dos autores citados anteriormente, que alegaram que esses valores permaneceram constantes no decorrer da lactação.

Os achados deste estudo vão de encontro aos achados de Kiermeier e Meinl (1961), que constataram que a concentração de ALP permanece constante após o período colostrar. Neste experimento houve aumento da concentração de ALP e é possível que esteja relacionado a casos de mastite dentro do conjunto de animais avaliados segundo Singh e Ganguli, (1975) que afirmaram que a mastite causa elevação da atividade a ALP.

Tabela 5: Médias da concentração de fosfatase alcalina (U/L) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação provenientes de fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	FOSFATASE ALCALINA	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
Parto	2.766,08	± 1.431,97	A
5	2.463,04	± 420,69	A
10	2.165,00	± 337,05	A
30	294,29	± 93,76	E
60	309,51	± 113,57	E
90	375,29	± 134,71	D
120	496,58	± 150,88	C
150	496,09	± 167,50	C
180	665,09	± 336,31	B

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

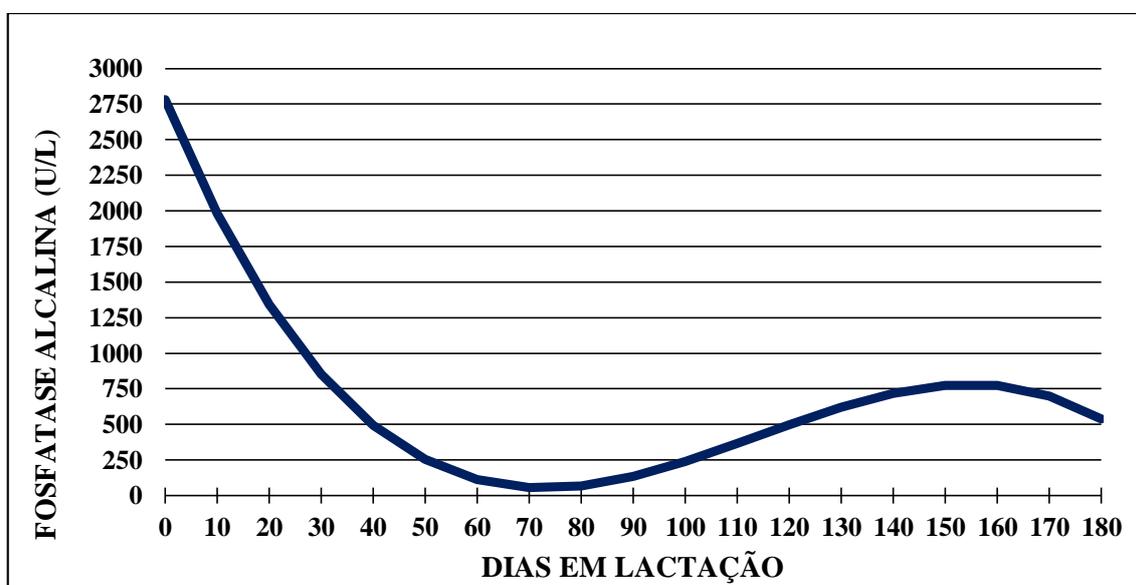


Gráfico 5: Gráfico da regressão da concentração de Fosfatase Alcalina no soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $2781,34225 - 88,827609 d + 0,896376 d^2 - 0,002623 d^3$ $P < 0,0000$ $R^2 = 93,56\%$

3.6 GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE (GGT)

A tabela 6 mostra as médias da concentração de Gama-glutamil Transferase no soro leite do parto até o terço-médio da lactação. O gráfico 6 ilustra o comportamento da concentração de Gama-glutamil Transferase no leite através da curva de regressão no decorrer dos 180 dias de lactação. A curva possui função cúbica e expressa que a concentração de GGT diminui acentuadamente a

do parto até aos 60 dias de lactação sendo este período o de menor concentração deste analito. A partir deste momento, a concentração de GGT apresentou elevação da concentração de forma considerável até aos 150 dias de lactação, passando então a sofrer redução até aos 180 dias.

Ainda de acordo com a tabela 6 a concentração de gama-glutamil transferase reduziu significativamente aos 5 dias de lactação e aos 10 dias de lactação quando comparados ao parto (dia

zero). Aos 30 dias de lactação, a concentração de GGT manteve-se significativamente constante quando comparada aos 10 dias de lactação. Dos 30 dias de lactação aos 60 dias de lactação houve um aumento da concentração de GGT significativo. Não houve diferença significativa dos 60 dias de lactação aos 180 dias de lactação.

Na fase colostrada, a concentração de GGT mostrou-se intensamente elevada neste trabalho corroborando com Zanker *et al.* (2001), Pero *et al.* (2006) e Franciosi *et al.* (2009). Apresentou diminuição significativa até os 30 dias de lactação e aumento significativo aos 60 dias de lactação e a partir desse tempo, se manteve constante, o que vai de encontro com Zanker *et al.* (2001) que afirmaram que a atividade da GGT no leite decai gradualmente com o passar do tempo de lactação.

Os valores da concentração de GGT encontrados no parto e 30 dias de lactação neste trabalho

foram respectivamente 35.046,72 U/L e 2.232,08 U/L. Esses valores foram altos quando comparados com os valores achados por Ontsouka *et al.* (2003) que acharam 8.218,35 U/L para o parto e 1.439,71 U/L para os 30 dias de lactação, utilizando o mesmo aparelho para dosagem deste analito.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que mensurem a concentração de gama-glutamil transferase no decorrer da lactação e apesar de a metodologia deste trabalho ser semelhante à de Ontsouka *et al.* (2003) os resultados diferiram entre si. Não se sabe ao certo em que circunstâncias a concentração de GGT pode ser alterada no leite, como raças, espécies, tempo de lactação e mês do parto, assim, essa diferença pode ter sido causada por diversos fatores que não foram abordados neste trabalho.

Tabela 6: Médias da concentração de gama-glutamil transferase (U/L) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

DIAS EM LACTAÇÃO	GGT	DESVIO PADRÃO	COMPARAÇÃO
Parto	35.046,72	± 17.529,25	A
5	4.393,00	± 2.768,35	B
10	2.915,20	± 1.317,35	DE
30	2.232,08	± 697,20	E
60	3.025,50	± 779,00	CD
90	3.491,71	± 714,35	BC
120	3.370,07	± 679,63	BC
150	3.617,28	± 929,67	BC
180	4.199,38	± 935,95	B

Letras diferentes representam diferença estatística segundo método de Análise de Variância (p<0,05).

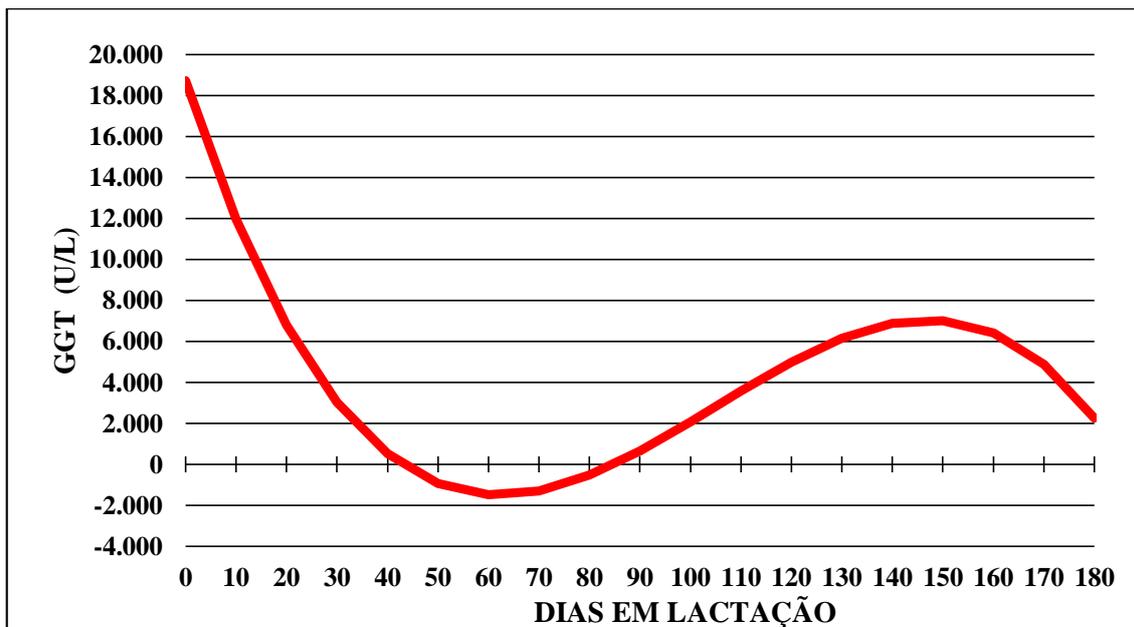


Gráfico 6: Gráfico da regressão da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) do soro do leite (n=25) de vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) até 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia, expressa pela fórmula $18.707,4146 - 758,288153 d + 8,690169 d^2 - 0,027695 d^3$ $P < 0,0000$ $R^2 = 42,78\%$

3.7 CORRELAÇÕES

Houve correlação do cálcio com o cloreto ($r^2 = 0,29$), com o magnésio ($r^2 = 0,52$) e com o fósforo ($r^2 = 0,43$). Essa correlação do cálcio com o fósforo é explicada, pois os dois minerais encontram-se intimamente relacionados em diversos fenômenos fisiológicos do corpo (Ferreira *et al.*, 2004). Já a correlação do cálcio com o magnésio é explicada por (Hunt e Nielsen, 2009), que afirmaram que o magnésio atua na regulação intracelular de cálcio.

Por outro lado, ocorreu correlação da GGT com cloreto ($r^2 = 0,26$), com magnésio ($r^2 = 0,88$), com fósforo ($r^2 = 0,19$), com cálcio ($r^2 = 0,49$) e com fosfatase alcalina ($r^2 = 0,60$). Isso quer dizer que à medida em que aumenta a concentração da gama-glutamil transferase, aumenta a concentração dos analitos citados. Sabe-se que o magnésio atua como cofator de diversas enzimas sendo o cátion mais prevalente e necessário para as reações enzimáticas (Volpe, 2006). Não se sabe ao certo como os demais minerais e a fosfatase alcalina estão associados com a presença de GGT no leite de vacas, porém, ressalta-se aqui a suma importância desses

minerais para que a GGT cumpra sua função no leite, que é o transporte de aminoácidos a partir do sangue para a glândula mamária (Viña *et al.*, 2001) e assim atuar na biossíntese de proteínas do leite (Baumrucker e Pocius, 1978).

Foi encontrado correlação negativa, apesar de baixa, ($r^2 = -0,16$) da concentração de magnésio com a Quantificação Bacteriana. À medida que a concentração de magnésio aumenta, a Quantificação bacteriana diminui. Isso nos informa que, em casos de mastite, onde há predomínio de bactérias presentes no leite, a concentração de magnésio no leite diminui.

Houve também a correlação do magnésio com o fósforo ($r^2 = 0,27$). Essa correlação pode ser explicada devido ao fato do magnésio participar ativamente de vários processos fisiológicos do corpo, como controlador na transmissão nervosa, esquelética, contração muscular, excitação cardíaca dentre outros (Hunt e Nielsen, 2009).

Outra correlação achada neste estudo foi a correlação do cloreto com a Contagem Bacteriana total ($r^2 = 0,48$) e Contagem de Células Somáticas ($r^2 = 0,47$). À medida que a

quantidade de bactérias presentes no leite aumentou a concentração de cloretos também. Esses achados corroboram com Morsi, *et al.* (2000) que afirmaram que patógenos causadores de mastite aumentam a concentração de cloreto no leite. Com relação à Contagem de Células Somáticas (CCS), em casos de mastite, onde a quantidade de células somáticas no leite é alta, a concentração de cloreto também se encontra elevada.

A correlação da CCS com o magnésio ($r^2=0,18$) foi positiva, ou seja, em quadros de mastite, onde ocorre aumento das células somáticas, aumenta a concentração de magnésio. A correlação da CCS com o cálcio ($r^2=0,14$) foi positiva, mostrando que, em situações em que a mastite esteja presente, a concentração de cálcio é elevada. Na correlação da CCS com a fosfatase alcalina ($R^2=0,24$) acontece da mesma forma em que as citadas anteriormente, ou seja, em casos de mastite, ocorre elevação da concentração de

fosfatase alcalina no leite de vacas. Por fim, também ocorreu correlação da CCS com a GGT ($r^2=0,16$). Seguindo o mesmo raciocínio para os demais analitos supracitados, em quadros em que se verifica a presença da mastite, seja clínica ou subclínica, ocorre o aumento da concentração da gama-glutamil transferase.

4 CONCLUSÕES

- Em presença de grande quantidade de bactérias, a concentração de magnésio diminui no leite de vacas;
- Em quadros de mastite onde há alta contagem de células somáticas ocorre aumento da concentração de magnésio, cloretos e cálcio no soro do leite;
- Em quadros de mastite onde há alta contagem de células somáticas ocorre elevação da concentração de fosfatase alcalina e de gama-glutamil transferase no leite.

CAPÍTULO III

CONTAGEM DIFERENCIAL CELULAR DO LEITE DE VACAS GIROLANDAS DO PARTO AOS 180 DIAS DE LACTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos são células sanguíneas de origem medular que sofrem maturação e são liberados na corrente sanguínea através de sinusóides medulares fazendo migração tecidual quando necessário (Stockhan e Scott, 2011).

A produção e maturação de linfócitos ocorre nos linfonodos, baço e timo, que contém precursores de linfócitos B, T e Nulos. Após a diferenciação estimulada por agentes mediadores de linfócitos B e T, deixam os linfonodos pelos vasos linfáticos passando a circular pela corrente sanguínea e através dela, penetram nos tecidos (Stockhan e Scott, 2011).

As células epiteliais são reconhecidas por atuar na mediação da resposta imune inata na infecção. Receptores presentes nas células epiteliais reconhecem componentes específicos bacterianos dando início à cascata de eventos que causa a produção de citocinas e agentes quimiotáticos (Gray *et al.*, 2005; Rainard e Riollet, 2006).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Após da coleta do leite, foram confeccionadas lâminas de acordo com o capítulo I, seguindo a técnica de Prescott e Breed (1910) modificada (Benites *et al.*, 2001). Em seguida à coloração foi realizada observação de campos ópticos necessários para obtenção da contagem de 100 células em objetiva de 100x utilizando-se óleo de imersão. As células foram classificadas como neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e células epiteliais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos valores relativos e absolutos das concentrações de neutrófilos no leite no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem

como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 1 e ilustrado pelo gráfico 1.

As médias dos valores relativos da concentração de neutrófilos que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas se apresentaram constantes durante todo o experimento. Já as médias dos valores absolutos, que indicam a quantidade real de células presentes no leite, se mantiveram constantes do parto (dia zero) aos 90 dias, sofrendo redução aos 120 dias de lactação. As médias dos valores da Contagem das Células Somáticas foram discutidas no capítulo 1. Essas médias sofreram diminuição significativa aos 5 dias de lactação, se mantendo constante durante toda a avaliação. Quando comparada com as outras populações celulares, a população de neutrófilos se sobressaiu em relação às demais populações celulares estudadas, o que corrobora com Sarikaya *et al.* (2006).

A média dos valores relativos de neutrófilos no leite de vacas neste trabalho foi 50,76%, valor este que se encontra abaixo do valor encontrado por Dulin *et al.* (1982) que obtiveram valores aproximados à 62,5%. Os períodos de 5 e 10 dias de lactação, se assemelharam aos achados desses autores, porém os mesmos não relataram um tempo de lactação específico para comparação. Em cabras, a média da concentração de neutrófilos encontrada por Droke *et al.* (1993) foi 87,3%, superior à média encontrada neste trabalho. Esse valor superior pode ter sido em virtude de a diferenciação celular ter sido feita em amostras retiradas do tanque de armazenamento e não diretamente de cada vaca em cada tempo específico como neste experimento.

Por outro lado, Schwartz *et al.* (2011a) encontraram intervalos para a população de neutrófilos em leite de vaca de 4,48% e 85,27% quando avaliados via citômetro. A média encontrada neste trabalho (50,76%) corrobora com os achados desses autores, entretanto o intervalo referenciado foi muito grande. Em um segundo trabalho, os mesmos autores Schwartz *et al.* (2011b) encontraram média geral de neutrófilos em vacas saudáveis de 19,94% quando avaliado diretamente por lâmina, o valor neste caso, vai de encontro aos achados no presente estudo. Neste experimento, a média dos valores das concentrações de neutrófilos aos 30 e

60 dias de lactação foram respectivamente 50,39% e 43,71% valores maiores que os achados por Miller *et al.* (1991) que encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 32,4% e 21,5%. Como esse período não é o período da lactação em que ocorre uma grande quantidade celular presente no leite como no parto, é possível que os valores de neutrófilos nesse período deste experimento, sejam indicativos de doença da glândula mamária como afirmaram Kehrlí e Shuster (1994).

As médias da concentração de neutrófilos encontradas aos 30 e 180 dias neste trabalho foram respectivamente de 50,39% e 59,15%. Esses valores foram mais altos do que os valores

encontrados por Dosogne, *et al.* (2003), que foram entre 10% e 20% aos 30 dias e 30% aos 180 dias.

Pilla *et al.* (2012) em estudos em três diferentes fazendas, encontraram na fazenda A, a média do valor de 58,68% de neutrófilos no leite. Na fazenda B, a média do valor encontrado foi 67,03% de neutrófilos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 31,79% de neutrófilos no leite. Nesta comparação, a média da concentração de neutrófilos encontrada neste experimento (50,76%) corrobora com os achados da fazenda A.

Tabela 1: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de neutrófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero), aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	39,44 ^a	60,24 ^a	60,24 ^a	50,39 ^a	43,71 ^a	52,76 ^a	44,80 ^a	46,16 ^a	59,15 ^a
VA	1.013.082 ^a	1.079.493 ^a	730.081 ^a	774.173 ^a	319.532 ^{ab}	527.964 ^{ab}	266.892 ^b	189.022 ^b	704.476 ^{ab}
DV	± 1.645.695	± 2.056.700	± 732.731	± 1.637.048	± 579.159	± 996.109	± 757.770	± 673.209	± 1.397.014
CCS	2.131.861 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	± 2.226.260	± 2.583.767	± 943.995	± 1.590.832	± 753.350	± 1.229.607	± 977.150	± 866.842	± 2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA (p<0,05). DV: Desvio Padrão.

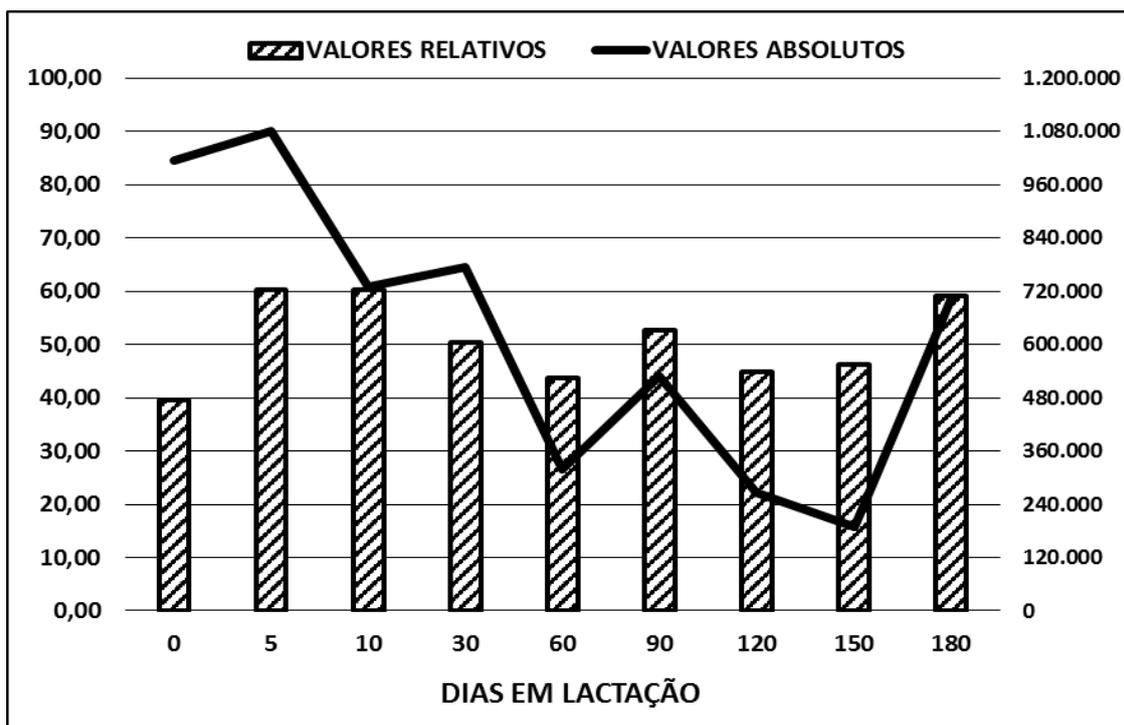


Gráfico 1: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de neutrófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$)

Com relação aos linfócitos no leite, as médias dos valores relativos e absolutos das concentrações no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 2 e ilustrado pelo gráfico 2.

As médias dos valores relativos da concentração de linfócitos que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas apresentaram redução aos 10 dias de lactação permanecendo então constante no decorrer do tempo. Da mesma forma, as médias dos valores absolutos, que indicam a quantidade real de células presentes no leite, apresentaram diminuição também aos 10 dias de lactação se mantendo constante no decorrer do experimento. As médias dos valores da Contagem das Células Somáticas foram discutidas no capítulo 1. Essas médias sofreram diminuição significativa aos 5 dias de lactação, se mantendo constante durante toda a avaliação. A média geral dos valores relativos de linfócitos no decorrer deste experimento foi 23,35%, sendo muito elevado quando comparado à média

encontrada por Dulin *et al.* (1982) que foi 0,7% de linfócitos presentes no leite de vacas.

Por outro lado, Schwartz *et al.* (2011a) encontraram intervalos para a população de linfócitos em leite de vaca de 2,37% e 87,75% quando avaliado por citômetro de fluxo. A média encontrada neste trabalho (23,35%) corrobora com os achados desses autores. Em um segundo trabalho, os mesmos autores Schwartz *et al.* (2011b) encontraram média geral de linfócitos em vacas saudáveis de 44,56% quando realizado através de lâmina, o que neste caso, vai contra aos achados no presente estudo.

As médias das concentrações de linfócitos aos 30 e 60 dias de lactação neste experimento foram respectivamente 21,99% e 15,95%, sendo o valor dos 30 dias próximos aos achados por Miller *et al.* (1991) que encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 24,3% e 22% respectivamente de linfócitos em vacas primíparas. Dosogne, *et al.* (2003) encontraram as médias de valores de linfócitos para os 30 dias entre 70% e 80% e aos 180 dias entre 50% e 60%

de lactação. Os valores para esses tempos neste trabalho foram de 21,99% e 17,50% estando abaixo dos limites inferiores descritos pelos autores supracitados.

Pilla *et al.* (2012) em estudos em três diferentes fazendas, encontraram na fazenda A, a média do valor de 28,97% de linfócitos no leite. Na

fazenda B, a média do valor encontrado foi 20,05% de linfócitos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 25,56% de linfócitos no leite. Nesta comparação, a média da concentração de linfócitos encontrada neste experimento (23,35%) corrobora com os achados das fazendas A, B e C.

Tabela 2: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de linfócitos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	45,36 ^a	32,80 ^a	22,72 ^{bc}	21,99 ^{bc}	16,69 ^{bc}	15,95 ^c	18,23 ^{bc}	18,96 ^{bc}	17,50 ^{bc}
VA	814.758 ^a	280.351 ^{ab}	170.419 ^c	78.636 ^c	104.553 ^c	82.806 ^c	73.712 ^c	75.401 ^c	167.678 ^{bc}
DV	± 800.559	± 259.697	± 204.375	± 96.431	± 135.337	± 155.909	± 171.986	± 177.079	± 341.654
CCS	2.131.86 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	± 2.226.260	± 2.583.767	± 943.995	± 1.590.832	± 753.350	± 1.229.607	± 977.150	± 866.842	± 2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA (p<0,05). DV: Desvio Padrão.

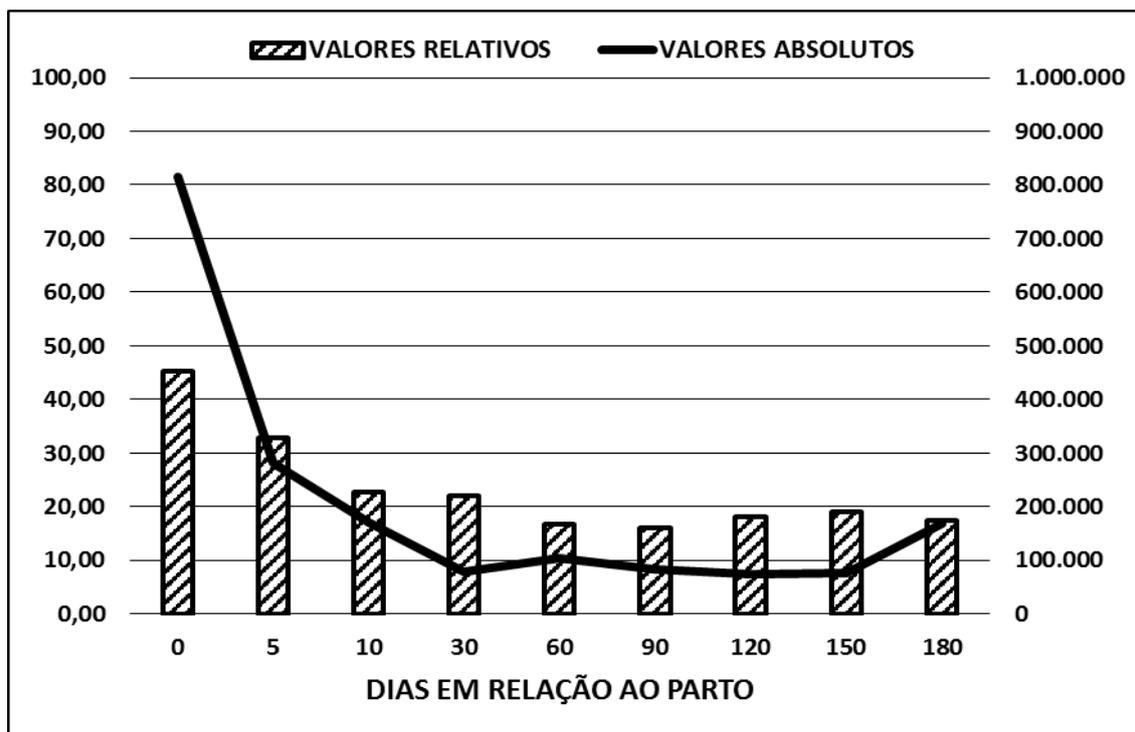


Gráfico 2: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de linfócitos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman (p<0,05)

Já quanto se trata dos macrófagos, as médias dos valores relativos e absolutos das concentrações no leite no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 3 e ilustrado pelo gráfico 3.

As médias dos valores relativos da concentração de macrófagos que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas não apresentaram diferenças significativas no decorrer do experimento da mesma forma que as médias dos valores absolutos. As médias dos valores da Contagem das Células Somáticas foram discutidas no capítulo 1. Essas médias sofreram diminuição significativa aos 5 dias de lactação, se mantendo constante durante toda a avaliação. A média geral dos valores relativos de macrófagos no decorrer deste experimento foi 5,21%, muito abaixo do valor encontrado por Dulin *et al.* (1982), que obtiveram resultado de 36,5% de macrófagos no leite de vacas e Droke *et al.* (1993) que acharam 9,9% de macrófagos em leite de cabra.

Por outro lado, Schwartz *et al.* (2011a) encontraram intervalos para a população de macrófagos em leite de vaca de 2,37% e 55,71%. A média encontrada neste trabalho (5,21%) corrobora com os achados desses autores. Em um segundo trabalho, os mesmos autores Schwartz

et al. (2011b) encontraram média geral de macrófagos em vacas saudáveis de 34,85%, o que neste caso, vai de encontro aos achados no presente estudo.

As médias das concentrações de macrófagos aos 30 e 60 dias de lactação neste experimento foram respectivamente 4,55% e 3,48%, sendo esses valores baixos quando comparados aos achados por Miller *et al.* (1991) que encontraram aos 30 e 60 dias de lactação valores de 25,1% e 36,9% respectivamente de macrófagos em vacas primíparas. Dosogne, *et al.* (2003) encontraram as médias de valores de macrófagos para os 30 dias (entre 0% e 10%) e 180 dias (10%) de lactação. Os valores para esses tempos neste trabalho foram de 4,55% e 4,81% estando abaixo dos limites inferiores descritos pelos autores supracitados.

Pilla *et al.* (2012) em estudos em três diferentes fazendas, encontraram na fazenda A, a média do valor de 12,35% de macrófagos no leite. Na fazenda B, a média do valor encontrado foi 12,92% de macrófagos no leite e na fazenda C, a média do valor encontrado foi 42,65% de macrófagos no leite. Nesta comparação, a média da concentração de macrófagos encontrada neste experimento (5,21%) se encontra abaixo dos achados das fazendas A, B e C.

Tabela 3: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de macrófagos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	4,24 ^a	5,84 ^a	4,34 ^a	4,55 ^a	3,48 ^a	5,36 ^a	8,82 ^a	5,52 ^a	4,81 ^a
VA	142.852 ^a	56.018 ^a	41.195 ^a	20.396 ^a	23.150 ^a	46.976 ^a	37.571 ^a	22.839 ^a	64.631 ^a
DV	±205.954	±105.442	±55.211	±48.441	±53.011	±77.367	±63.109	±48.788	±129.254
CCS	2.131.861 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	±2.226.260	±2.583.767	±943.995	±1.590.832	±753.350	±1.229.607	±977.150	±866.842	±2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA (p<0,05). DV: Desvio Padrão.

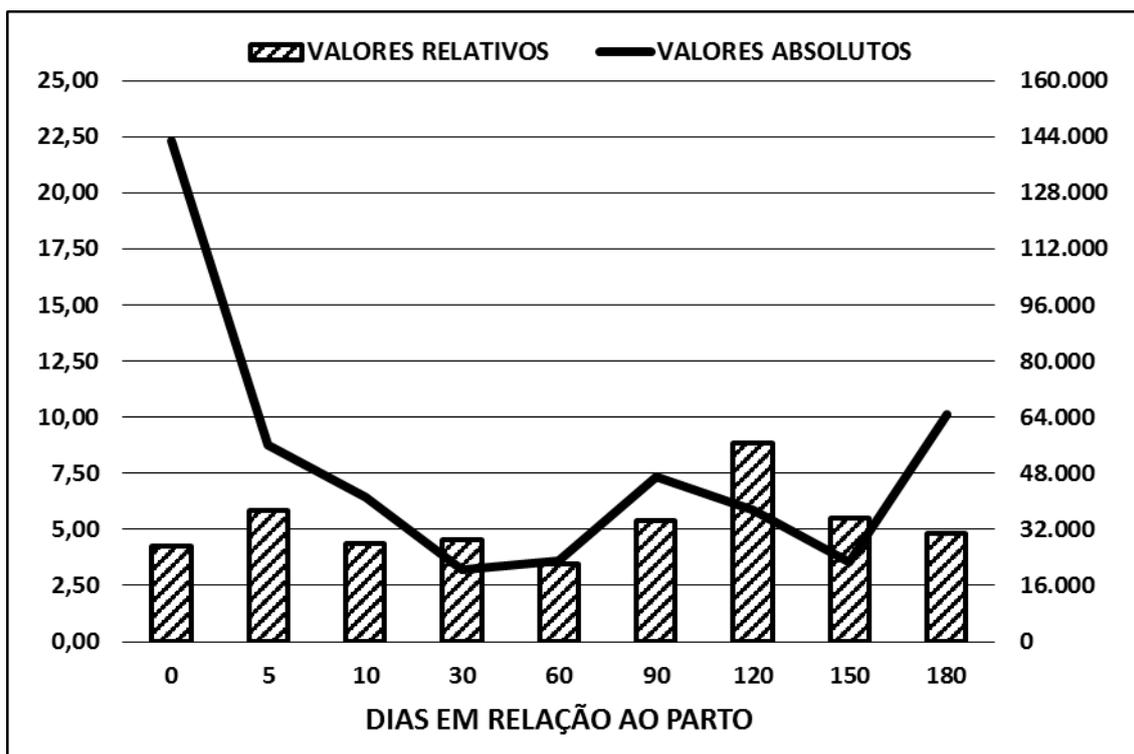


Gráfico 3: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de macrófagos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$)

Quanto aos eosinófilos, as médias dos valores relativos e absolutos das concentrações no leite no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 4 e ilustrado pelo gráfico 4.

As médias dos valores relativos da concentração de eosinófilos que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas mantiveram-se constantes no decorrer desse experimento, houve aumento significativo aos 180 dias de lactação quando comparados aos 60 dias de lactação. Já as médias dos valores absolutos, que indicam a quantidade real de células presentes no leite, houve redução significativa aos 60 dias quando comparado aos 5 dias de lactação, voltando ao aumento dos valores aos 180 dias de

lactação. As médias dos valores da Contagem das Células Somáticas foram discutidas no capítulo 1. Essas médias sofreram diminuição significativa aos 5 dias de lactação, se mantendo constante durante toda a avaliação.

A média geral dos valores das concentrações de eosinófilos no leite de vacas do presente trabalho foi 2,13%, muito acima dos valores encontrados por Dulin *et al.* (1982) que obtiveram o valor de 0,3% e acima também dos valores encontrados por Della Libera *et al.* (2004) em leite de búfalas (0,7%). Por outro lado, a média encontrada neste trabalho foi inferior à média encontrada também em leite de búfalas no trabalho de Silva e Silva, (1994) que foi 5% de eosinófilos.

Tabela 4: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de eosinófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	1,52 ^{abc}	4,40 ^{abc}	0,78 ^{abc}	0,91 ^{abc}	0,42 ^c	2,48 ^{abc}	2,33 ^{abc}	2,32 ^{abc}	4,08 ^a
VA	26.242 ^{abc}	122.975 ^{ab}	3.118 ^{abc}	1.338 ^{abc}	1.663 ^c	7.015 ^{abc}	8.107 ^{abc}	5.300 ^{abc}	19.422 ^{ab}
DV	± 77.340	± 416.103	± 56.509	± 55.781	± 55.636	± 57.832	± 53.212	± 52.424	± 35.802
CCS	2.131.861 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	±2.226.260	±2.583.767	±943.995	±1.590.832	±753.350	±1.229.607	±977.150	±866.842	±2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA ($p < 0,05$). DV: Desvio Padrão

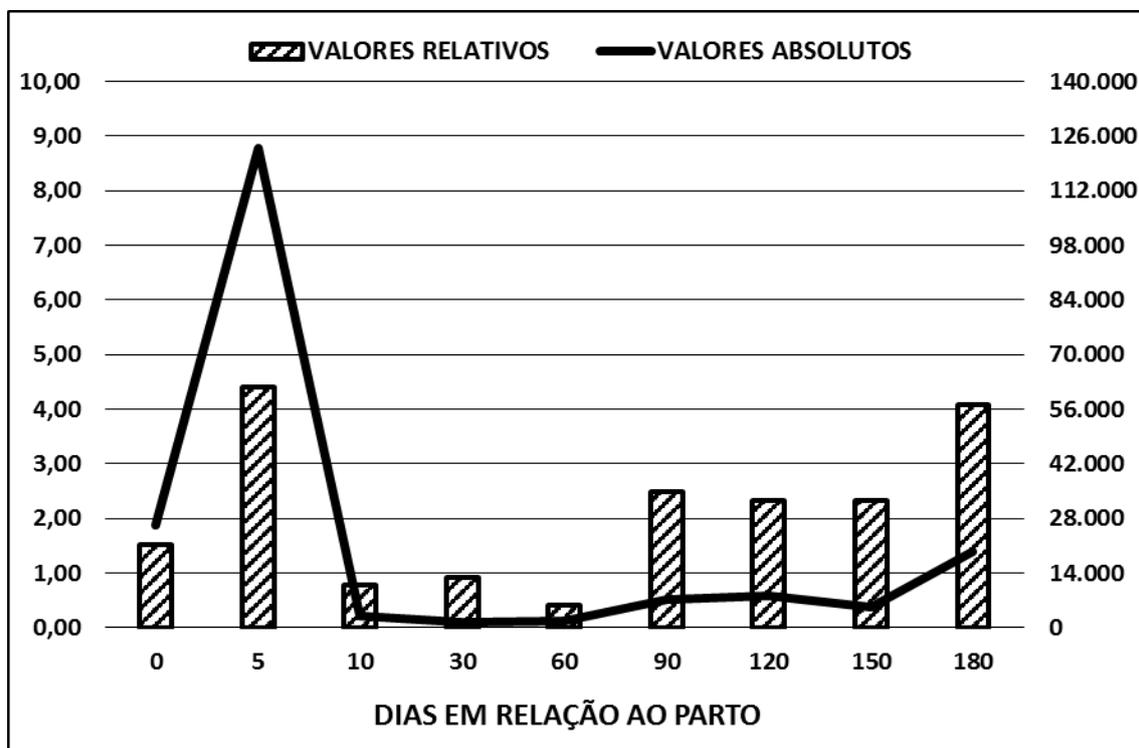


Gráfico 4: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de eosinófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$)

Já para as células epiteliais, as médias dos valores relativos e absolutos das concentrações no leite no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 5 e é ilustrado pelo gráfico 5.

As médias dos valores relativos da concentração de células epiteliais que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas mantiveram-se constantes no decorrer do tempo desse experimento.

A média geral dos valores das concentrações de células epiteliais no leite de vacas do presente trabalho foi 3,94%, em conformidade com Ribas (1999) que afirmou que do total de células somáticas, de 2 a 25% são células epiteliais. A média deste trabalho se encontrou acima dos valores que Dulin *et al.* (1982) encontraram. Esses autores relataram que as células epiteliais equivalem à menos de 1% de todas as células presentes no leite. Quando comparado com Contreras *et al.* (1998) que afirmaram que a porcentagem de células epiteliais presentes no leite de cabras em glândulas não infectadas equivale à 6% do total de células, o valor do presente trabalho se encontra abaixo do que foi encontrado por esses autores.

As médias dos valores das concentrações aos 30 e 60 dias de lactação neste experimento foram respectivamente de 4,72% e 2,57%. Esses valores estão muito abaixo dos encontrados por

Miller *et al.* (1991) que acharam valores para esses tempos de 17,4% e 19,6% respectivamente. Quando comparado aos trabalhos de Silva e Silva (1994), que acharam valor da concentração de células epiteliais de 5% em leite de búfalas, a média deste trabalho (3,94%) é semelhante. Porém, neste experimento não foi verificado o predomínio de células epiteliais no leite de vacas. Isso vai de encontro aos achados de Dhakal *et al.* (1992) que afirmaram que há o predomínio de células epiteliais no leite de búfalas quando comparadas as duas espécies.

Capuco *et al.* (2001) relatam que as células epiteliais mamárias de vacas diminuem em número com o decorrer da lactação (aproximadamente 50% em toda a lactação). Esse fato não se verificou neste experimento, uma vez que, segundo a metodologia estatística aplicada, a concentração de células epiteliais se manteve constante até os 180 dias de lactação tanto em valores absolutos quanto em relativos.

Tabela 5: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de células epiteliais no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	0,24 ^a	2,88 ^a	1,65 ^a	4,72 ^a	2,57 ^a	2,71 ^a	3,80 ^a	5,24 ^a	11,65 ^a
VA	3.196 ^a	11.069 ^a	6.158 ^a	6.613 ^a	11.354 ^a	11.354 ^a	12.602 ^a	13.524 ^a	97.759 ^a
DV	± 31.264	± 41.182	± 31.817	± 31.315	± 30.972	± 30.972	± 32.801	± 33.462	± 232.840
CCS	2.131.861 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	±2.226.260	±2.583.767	±943.995	±1.590.832	±753.350	±1.229.607	±977.150	± 866.842	± 2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA (p<0,05). DV: Desvio Padrão

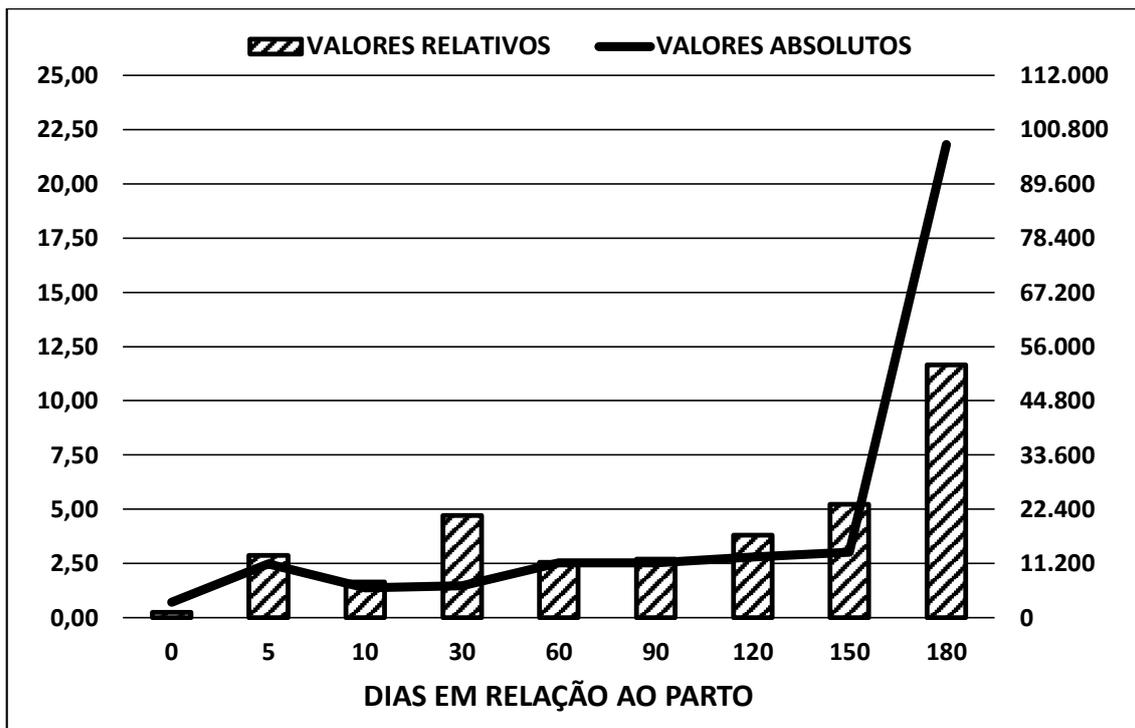


Gráfico 5: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de células epiteliais no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$)

Por fim, em avaliação dos basófilos, as médias dos valores relativos e absolutos das concentrações no decorrer do terço inicial e terço médio da lactação, bem como a Contagem de Células Somáticas se encontram na tabela 6 e é ilustrado pelo gráfico 6.

As médias dos valores relativos da concentração de basófilos que expressam uma porcentagem da Contagem de Células Somáticas mantiveram-se constantes no decorrer do tempo desse experimento. Já as médias dos valores absolutos, que indicam a quantidade real de células presentes no leite, sofreram diminuição significativa aos 30 e 60 dias de lactação. A partir dos 90 dias de lactação, houve aumento na concentração de basófilos no leite, se mantendo constantes até os 180 dias.

A média dos valores das concentrações no início da lactação considerando os momentos do parto, 5 dias, 10 dias e 30 dias de lactação neste estudo

foi 2,98%. Já a média dos valores das concentrações de basófilos no meio da lactação considerando os momentos 60 dias, 90 dias e 120 dias de lactação foi 3,95%. As médias dos valores das concentrações de basófilos no fim da lactação, levando em conta os momentos 150 dias e 180 dias de lactação foi 3,34%.

Cabe ressaltar ainda que, não foram encontrados trabalhos que relatem os valores absolutos de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais e basófilos presentes no leite no decorrer da lactação. A metodologia utilizada neste trabalho foi diferente das utilizadas pelos autores supracitados, uma vez a maioria utiliza citocentrífugas para posterior preparo de lâminas. O preparo de lâminas neste estudo foi feito com o leite *in natura*, ou seja, assim que coletado, foi utilizado para preparo das lâminas. Esse fato pode ter contribuído para as diferenças encontradas neste experimento quando comparado aos demais autores.

Tabela 6: Médias dos Valores Relativos (VR) e Valores Absolutos (VA) da concentração de basófilos no leite de 25 vacas mgirolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia

	DIAS EM RELAÇÃO AO PARTO								
	0	5	10	30	60	90	120	150	180
VR (%)	5,20 ^a	2,16 ^a	2,89 ^a	1,69 ^a	1,76 ^a	4,14 ^a	5,97 ^a	3,88 ^a	2,81 ^a
VA	91.458 ^a	31.465 ^{ab}	16.876 ^{ab}	1.884 ^c	12.627 ^b	31.647 ^{ab}	20.591 ^a	13.056 ^{ab}	17.811 ^{ab}
DV	±104.687	±64.104	±16.546	±21.166	±29.830	±45.928	±32.745	±18.944	±37.463
CCS	2.131.861 ^a	1.523.872 ^{ab}	971.744 ^b	891.487 ^b	494.966 ^b	726.210 ^b	427.412 ^b	328.823 ^b	1.071.777 ^b
DV	±2.226.260	±2.583.767	±943.995	±1.590.832	±753.350	±1.229.607	±977.150	±866.842	±2.049.609

Letras diferentes representam diferença significativa para VR segundo método de Friedman e para VA segundo ANOVA ($p < 0,05$). DV: Desvio Padrão.

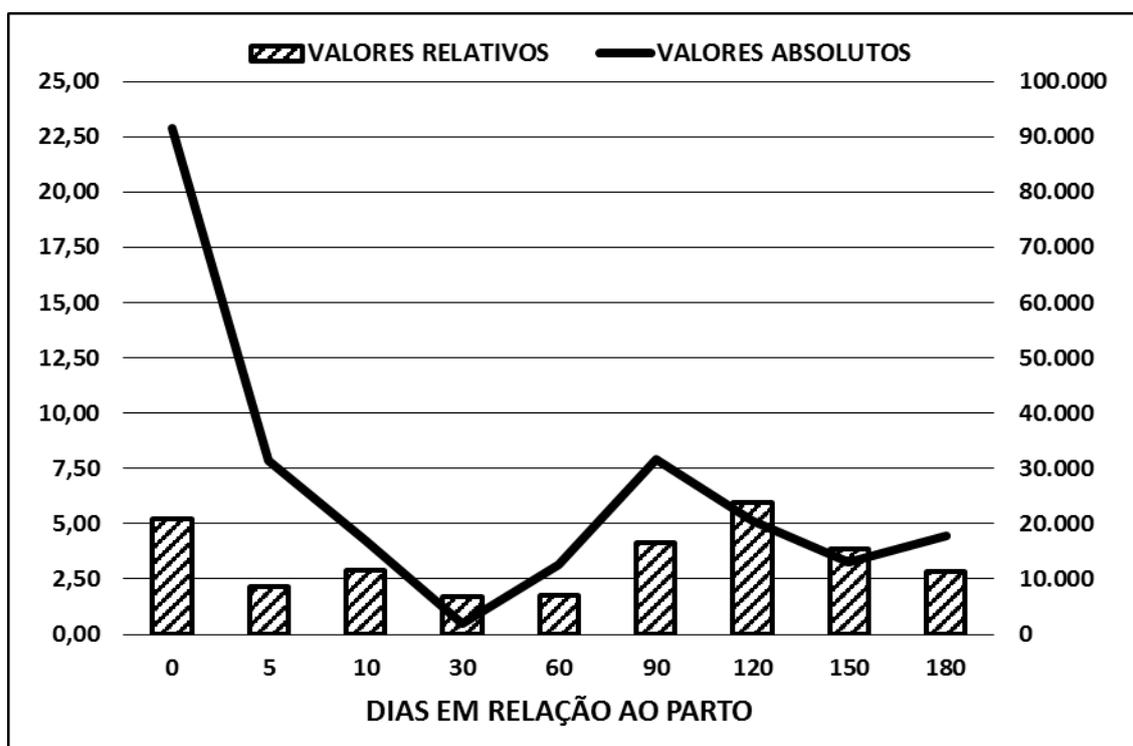


Gráfico 6: Gráfico das médias dos valores relativos (%) e valores absolutos da concentração de basófilos no leite de 25 vacas girolandas pluríparas do parto (dia zero) aos 180 dias de lactação em uma fazenda comercial do município de Martinho Campos sob regime semi-intensivo com ordenha mecânica duas vezes ao dia. Método de Friedman ($p < 0,05$)

3.1 CORRELAÇÕES

Houve correlação positiva da Contagem de Células Somáticas com a concentração de neutrófilos ($r^2=0,97$), linfócitos ($r^2=0,64$), eosinófilos ($r^2=0,59$), macrófagos ($r^2=0,60$), células epiteliais ($r^2=0,28$) e basófilos ($r^2=0,66$). Isso significa que à medida que aumenta as células somáticas presentes no leite, o número de individual das células também aumenta. Esse fato ocorre devido à necessidade de constituição de uma linha de defesa contra os patógenos que causam infecção, bem como a apresentação de antígenos realizadas por macrófagos aos linfócitos presentes no leite para execução de suas funções. A maior correlação observada foi entre CCS e neutrófilos, o que confirma a diapedese e migração deste tipo celular para glândula mamária e sua liberação pelo leite (Stockhan e Scott, 2011).

Houve correlação negativa da Quantificação Bacteriana com a concentração de neutrófilos ($r^2=-0,30$), linfócitos ($r^2=-0,38$), macrófagos ($r^2=-0,22$) e basófilos ($r^2=-0,19$). Isso significa que à medida que essas células aumentam em concentração no leite, diminui as bactérias presentes, mostrando assim que essas células têm potencial para destruição e eliminação dos patógenos presentes em quadros de mastite. Não houve correlação de eosinófilos e células epiteliais com a Contagem Bacteriana Total. Isso demonstra que essas células não possuem função na destruição e eliminação de micro-organismos presentes em quadros de mastite.

Houve correlação positiva da concentração de neutrófilos com a concentração de linfócitos ($r^2=0,44$), eosinófilos ($r^2=0,61$), macrófagos ($r^2=0,49$), células epiteliais ($r^2=0,21$) e basófilos ($r^2=0,58$). Comprova quimiotaxia iniciada por neutrófilos. Isso mostra que os neutrófilos são as principais células, que atuam primeiramente da destruição e fragmentação de micro-organismos. Os eosinófilos possuem mesma função, porém, em menor concentração e os basófilos, possuem potencial fagocítico mínimo (Murphy *et al.*, 2008). Os fragmentos produzidos por essas células são fagocitados por macrófagos para posterior apresentação aos linfócitos. As células epiteliais se fazem presentes na mediação da resposta imune com produção de citocinas e agentes quimiotáticos (Gray *et al.*, 2005; Rainard e Riollot, 2006).

Houve correlação positiva da concentração de linfócitos com a concentração de eosinófilos ($r^2=0,17$), macrófagos ($r^2=0,59$), células epiteliais ($r^2=0,21$) e basófilos ($r^2=0,49$). Isso mostra a dependência dos linfócitos para exercício de suas funções, das células que atuam como destruidoras de patógenos como os eosinófilos e basófilos, e das células que atuam como apresentadoras de antígenos como os macrófagos.

Na bioquímica, houve correlação positiva do cloreto com os neutrófilos ($r^2=0,39$), linfócitos ($r^2=0,58$), macrófagos ($r^2=0,43$) e basófilos ($r^2=0,34$), ou seja, à medida aumenta a concentração dessas células no leite, aumenta a concentração de cloretos. Segundo Meotti, (2013) essas células produzem intermediários de oxigênio para combater à reação inflamatória por ação catalítica de enzimas. Para essa produção, é necessária a presença de cloreto.

Também ocorreu correlação positiva do magnésio com os linfócitos ($r^2=0,29$), macrófagos ($r^2=0,24$) e basófilos ($r^2=0,37$). Segundo Amorim e Tirapegui (2008) o magnésio atua como co-fator na maioria das reações orgânicas, além disso, a falta de magnésio pode levar à falha na integridade das membranas celulares sendo por isso existente a correlação entre ele e as células. Foi avaliado neste estudo que linfócito é o segundo tipo celular mais predominante no leite de vacas, e segundo Sarikaya *et al.* (2006), a concentração de linfócitos diminui com o aumento das células somáticas. Deve-se considerar que, em quadros de mastite, onde ocorre grande concentração celular no leite, a população de linfócitos diminui e consequentemente diminui a concentração de magnésio no leite.

Houve correlação positiva do Cálcio com linfócitos ($r^2=0,27$) e basófilos ($r^2=0,17$). Tatlock *et al.* (1997) afirmou que os linfócitos usam cálcio para ativação da síntese de citocinas como a Interleucina-2. Assim, explica-se a necessidade desse mineral para o bom funcionamento da resposta imune.

Para as enzimas avaliadas no capítulo 3, houve correlação positiva da Fosfatase Alcalina com neutrófilos ($r^2=0,18$), linfócitos ($r^2=0,32$), macrófagos ($r^2=0,23$) e basófilos ($r^2=0,27$). À medida em que ocorre o aumento da

concentração de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e basófilos, aumenta a concentração de Fosfatase Alcalina no leite de vacas. Sabe-se que o aumento dessas células no leite é indicativo de quadros de mastite clínica e subclínica, então, é possível cogitar a possibilidade de a Fosfatase Alcalina no leite ser um indicador laboratorial de quadros de mastite. Para a gama-glutamil transferase houve correlação positiva com linfócitos ($r^2=0,36$), macrófagos ($r^2=0,21$) e basófilos ($r^2=0,32$). Isso quer dizer que, à medida que aumenta o número dessas células no leite, aumenta a concentração de gama-glutamil transferase.

4 CONCLUSÕES

- Neutrófilos são as células predominantes no leite em todos os períodos de lactação, seguidas de linfócitos e macrófagos;
- Os neutrófilos são os principais responsáveis pelo aumento da contagem de células somáticas no leite em casos de infecção da glândula mamária;
- A contagem de células epiteliais no leite não acompanha a variação da contagem de células somáticas.
- O aumento da concentração de cloretos, magnésio, cálcio, fosfatase alcalina e GGT no leite, acompanha o aumento da concentração de linfócitos no mesmo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBENZIO, M.; CAROPRESE, M.; SANTILLO, A. *et al.* Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 533-542, 2004.
- AMORIM, A. G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. *Revista de Nutrição*, v. 21, n. 5, p. 563-575, 2008.
- ANDRADE, M. A.; MESQUITA, A. J.; CARVALHO, F. *et al.* Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção do leite. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária*, v.28, n.1, 1998. 29-42p.
- ANDREWS, A. T.; ALICHANIDIS, E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine Milk. *Journal of Dairy Research*, v. 50, p. 275-290, 1983.
- ANDREWS, A. T.; ANDERSON, M.; GOODENOUGH, P. W. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. *Journal of Dairy Science*, v. 54, p. 237-246, 1987.
- ANDREWS, A. T.; OLIVECRONA, T.; VILARO, S. *et al.* Indigenous enzymes in milk. In: FOX, P. F. (Ed.) *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*. 2. ed., v.1. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 267-285.
- ATHIÊ, F. *Uma proposta adequada de manejo*. 3. ed. Nobel, 1988. 96-97p.
- AWUMEY, E. M.; BUKOSKI, R. D. Cellular functions and fluxes of calcium. In: WEAVER, C. M.; HEANEY, R. P. (Eds.) *Calcium Human Health*. Totowa: Humana Press, 2006. p. 13-25.
- BANNERMAN, D. D.; CHOCKALINGAM, A.; PAAPE, M. J. *et al.* The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 107, n. 3-4, p. 201-215, 2005.
- BARBOSA, S. B. P.; MONARDES, H. G.; CUE, R. I. *et al.* Avaliação da contagem de células somáticas na primeira lactação de vacas holandesas no dia do controle mensal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 1, p. 94-102, 2007.
- BAROZA, P. F. J. Proteínas, enzimas e minerais na secreção láctea de cabras e vacas, nos primeiros 30 dias pós-parto, congelada ou não. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP/Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- BARKEMA, H. W.; VAN DER SCHANS, J.; SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 422-426, 1997.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HEIDER, L. E. Use of bulk tank and milk filter cultures in screening for *Streptococcus agalactiae* and coagulase-positive *Staphylococci*. *Journal of Food Protection*, v. 54, n. 11, p. 848-851, 1991.
- BAUMRUCKER, C. R.; POCIUS, P. A. γ -glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat. *Journal of Dairy Science*, v. 61, p. 309-314, 1978.
- BENHAMED, N.; MOULAY, M.; AGGAD, H. *et al.* Prevalence of mastitis infection and identification of causing bacteria in cattle in the oranregion west algeria. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 10, n. 22, p. 3002-3005, 2011.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração hematoxilina e eosina. *Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 4, n. 3, p. 6-9, 2001.
- BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 23. ed. São Paulo: Melhoramentos. 1984. 1284p.
- BINGHAN, E. W.; GARVER, K.; POWLEM, D. Purification and properties of alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary

gland. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 3394-3401, 1992.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. *Medicina veterinária*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 225-230p.

BLOWEY, R.; DAVIS, J.; EDMONDSON, P. Bacterial counts in bulk milk-na underused investigation technique. *In Practice*, v. 19, n. 3, p. 122-127, 1997.

BLUM J.W.; DOSOGNE, H.; HOEBEN, D. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 19, p. 223-235, 2000.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L. *et al.* Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 12, p. 4104-4114, 2004.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 1845, 2001.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. A study of the incidence and significance of enterobacterial infections acquired during the non-lactating period of dairy cattle under UK field conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1957-1965, 2000.

BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H.; GRIFFIN, T. *Mastitis control and herd management*. Ayr: National Institute for Research in Dairying. 1981. 290p.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology: The microbiology of milk*. 2.ed. Barking: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 163-208.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Acesso em: 09 fev 2013. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3331>

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Acesso em: 13 mar 2013. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>

BRAUN, J. P.; TAINURIER, D.; LAUGIER, C. *et al.* Early variations of blood plasma gamma-glutamyl transferase in newborn calves – a test of colostrums intake. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 2178-2181, 1982.

BRITO, M. A. *et al.* Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento - EMBRAPA - Agronegócio do Leite – Mastite Acesso em: 11 fev 2013. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M. *et al.* Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

BRITTEN, A. M. The hole of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, p. 187-202, 2012.

BROUILLETTE, E.; MARTINEZ, A.; BOYLL, B. J. *et al.* Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 41, p. 35-41, 2004.

BRUCKMAIER, R. M.; ONTSOUKA, C. E.; BLUM, J. W. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Veterinární Medicína – Czech*, v. 49, n. 8, p. 283-290, 2004.

BRUCKMAIER, R. M.; ROTHENANGER, E.; BLUM, J. W. Measurement of mammary gland cistern size and determination of the cisternal milk fraction in dairy cows. *Milchwissenschaft*, v. 49, p. 543, 1994.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N. *et al.* Contagem Bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no estado de Goiás.

Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

BUELOW, K. L.; THOMAS, C. B.; GOODGER, W. J. *et al.* Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 2, p. 1-8, 1996.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS V.; MEHRZAD J. *et al.* Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*, v.34, p.521-562, 2003.

CAPUCO, A. V.; WOOD, D. L.; BALDWIN, R. *et al.* Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST¹. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.2177-2187, 2001.

CATTELL, M. B. An outbreak of *Streptococcus uberis* as a consequence of adopting a protocol of no antibiotic therapy for clinical mastitis. In: THE 35TH NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 1996, Nashville. *Proceedings of the 35th national mastitis council annual meeting*. Nashville, 1996. 123p.

CAVALCANTE, F. A. Manejo necessário no rebanho leiteiro para uma boa ordenha. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Acesso em: 02 abr. 2013. Disponível em: <http://catuaba.cpfac.embrapa.br/pdf/cirtec47.pdf>

CEBALLOS, L. S.; MORALES, E. R.; ADARVE, G. T. *et al.* Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.322-329, 2009.

CERBULIS, J.; FARREL Jr., H. M. Composition of the milks of dairy cattle: Ash, calcium, magnesium and phosphorus. *Journal of Dairy Science*, v.59, n.4, p. 589-593, 1975.

CHAMPOUX, J. J.; COREY, L.; NEIDHARDT, F. C. *et al.*, *Medical microbiology – An introduction to infectious diseases*. 2. ed. Elsevier, 1990. 1250p.

CHANDAN, R. C.; PARRY, R. M. Jr; SHAHANI, K. M. Lysozyme, lipase and ribonuclease in milk of various species. *Journal of Dairy Science*, v. 51, n. 4, p. 606-607, 1968.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 305–314, 1999.

COENTRÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F. *et al.* Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n.2, p. 283-288, 2008.

CONSTABLE, P. D.; WALKER, P. G.; MORIN, D. E. *et al.* Use of peripheral temperature and core-peripheral temperature difference to predict cardiac output in dehydrated calves housed in a thermoneutral environment. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, p. 874, 1998.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J. C. *et al.* Diagnostico indirecto de las mamitis caprinas. Mamitis caprina II. *Ovis*, v. 54, p. 25-36, 1998.

CUCARELLA, C.; TORMO, M. A.; ÚBEDA, C.; *et al.* Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J., *et al.* Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

DaRONG, G.; SHANYUAN, Z.; ZHAOHUA, Y. *et al.* Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, n. 11, p. 1110-1116, 2010.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAUJO, W. P.; KITAMURA, S. S. *et al.* Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no

- estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1087-1092, 2004.
- DHAKAL, I. P.; KAPUR, M.P.; SHARMA, A. 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.
- DINGWELL, R.T.; KELTON, D.F.; LESLIE, K.E. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice*, v.19, p.235-265, 2003.
- DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of chages in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 10, p. 225-237, 1991.
- DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic Cell Counts in Bovine Milk. *Canadian veterinary Journal*, v. 23, p. 119-125, 1982.
- DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J. *et al.* Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 828-834, 2003.
- DÖPFER, D.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. J. G. M. *et al.* Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 80-85, 1999.
- DROKE, E. A.; PAAPE, M. J. DI CARLO, A. L. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 1035-1039, 1993.
- DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WEINLAND, B. T. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 1247-1251, 1982.
- DURÃES, M. C.; FREITAS, A. F.; VALENTE, J. *et al.* Tendência genética para a produção de leite e de gordura em rebanhos, da raça holandesa no estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 1, p. 66-70, 2001.
- DVORAK, A. M.; MONAHAN, R. A. Guinea-pig bone marrow basophilopoiesis. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 2, p. 13-24, 1985.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro, 1996. 567-573p.
- ECKSTEIN, I. I.; POZZA, M. S. S.; TSUTSUMI, C. Y.; *et al.* Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas do leite cru em diferentes tipos e tempos de resfriamento. (2012). Acesso em: 27 ago. 2013. Disponível em: http://cacphp.unioeste.br/projetos/cmetloeste/pub_tecnicas/CONTAGEM_BACTERIANA_TOAL_ECONTAGEM_DE_CELULAS.pdf
- EDMONDSON, P. W.; BRAMLEY, A. J. Mastitis. In: ANDREWS, A.H. (Ed.) *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. 2. ed. Austrália: Blackwell – Science, 2004. p. 326-336.
- EL-FATTAH, A. M. A.; RABO, F. H. R. A.; EL-DIEB, S. M. *et al.* Changes in composition of colostrum of egyptian buffaloes and holstein cows. *Biomed Central Veterinary Research*, v. 8, n. 19, p. 1-7, 2012.
- FARKYE, N. Y. Indigenous enzymes in milk: other enzymes, In: FOX, P. F. (Ed.) *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, v.1. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 339-367.
- FAVUS, M. J.; BUSHINSKY, D. A.; LEMANN, J. J. Regulation of calcium, magnesium and phosphatase metabolismo. In: FAVUS, M. J. (Ed.) *Rimer on the Methabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6. ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006. p. 76-83.
- FERREIRA, P. M.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J. *et al.* *Doenças carenciais e suplementação mineral*. Belo Horizonte: Serviço de Mecanografia da EV/UFMG (Apostila-Texto didático), 2004.
- FERREIRO, L.; SANTOS, E. C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na “zona da mata” do estado de minas gerais. *Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 33, n. 1, p. 31-37, 1981.

- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176p.
- FORAR, F. L.; KINCAID, R. L.; PRESTON, R. L.; HILLERS, J. K. Variation of inorganic phosphorus in blood plasma and milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 760-763, 1982.
- FOX, P. F. *Advanced dairy chemistry - 3: Lactose, water, salts and vitamins*. 2. ed. Chapman and hall. 1997. 519p.
- FOX, P. F. Milk: an overview. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. (Eds.) *Milk proteins from expression to food*. Nova Zelândia: Elsevier, 2009. p. 1-24.
- FOX, P. F. Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (Eds.) *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 255-277.
- FRANCIOSI, C.; ROCHA, T. G.; ERNANDES, P. P. *et al.* Teores de minerais e atividade da enzima gamaglutamiltransferase no soro colostrado de vacas das raças canchim e holandesa e influência do número de lactações. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], p. 323-237, 2009.
- FRANSSON, G. B.; LONNERDAL, B. Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk. *Pediatric Research*, v. 17, p. 912-915, 1983.
- FREITAS, A. F.; DURÃES, M. C.; VALENTE, J. *et al.* Parâmetros genéticos para produções de leite e gordura nas três primeiras lactações de vacas holandesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 3, p. 709-713, 2001.
- GABLER, M. T.; RENEAU, J. K. FARNSWORTH, R. J. Comparison of number of *Streptococcus uberis* calculated on a volume or weight basis in sand and sawdust bedding. *American Journal of Veterinary Reserach*, v. 62, n. 2, p. 171-173, 2001.
- GAUCHERON, F. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, v. 45, p. 473-483, 2005.
- GOMES, S. T. Diagnóstico da Pecuária Leiteira do Estado de Minas Gerais em 2005. Acesso em: 10 jan 2013. Disponível em: <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=6065&fileDownload=True>
- GRAY, C.; STRANDBERG, Y.; DONALDSON, L. *et al.* Bovine mammary epithelial cells, initiators of innate immune responses to mastitis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 45, n. 8, p. 757-761, 2005.
- GREEN, M. J.; GREEN, L. E.; BRADLEY, A. J. *et al.* Prevalence and associations between bacterial isolates from dry mammary glands of dairy cows. *Veterinary Record*, v. 156, p. 71-77, 2005.
- HARDING, F. *Milk quality*. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 60-75p.
- HAZELL, T. Minerals in food: dietary sources, chemical forms interactions, bioavailability. *World Review of Nutrition and Dietetics*, v. 46, p. 1-123, 1985.
- HESS, J. L.; NEUDER, L. M.; SEARS, .P. M.; *et al.* Rethinking clinical mastitis therapy. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2003. *National Mastitis Council Proceedings*, v. 42, 2003. 372p.
- HILLERTON, J. E.; SEMMENS, J. E. Comparison of treatment of mastitis by oxytocin or antibiotics following detection according to changes in milk electrical conductivity prior to visible signs. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 93, 1999.
- HIRAI, K.; MIYAMASU, M.; TAKAISHI, T. *et al.* Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Critical Reviews in Immunology*, v. 17, p. 325-352, 1997.
- HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. *Veterinary Research*, v. 34, p. 507-519, 2003.
- HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing environmental mastitis. *Veterinary clinics of North America: Food Animal*, v. 28, p. 217-224, 2012.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A. *et al.* Bacterial counts associated with recycled newspaper bedding. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1756, 1990.

HOLT, C. Interrelationships of the concentrations of some ionic constituents of human milk and comparison with cow and goat milks. *Comparative Biochemistry and Physiology-Comparative Physiology*, v. 104, p. 35-41, 1993.

HOLT, C. *The milk salts: Their secretion, concentration and physical chemistry. Developments in dairy chemistry – 3: Lactose and minor constituents.* London: Elsevier applied science publishers, 1985. 143-181p.

HUNT, C. D.; NIELSEN, F. H. Nutritional aspects of minerals in bovine and human milks. In: McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3: Lactose, water, salts and minor constituents.* Spring Science+Business Media, 2009. p. 391-456.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal 2011. Acesso em: 09 fev 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab06.pdf

INTERNATIONAL IDF STANDART. *Enumeration of somatic cells*, 148:1991.

JAIN, N. C. *Shalm's veterinary Hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

JARRETT, W. D. A review of the important trace elements in dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 34, p. 28-34, 1979.

JOHNSTON, S. L.; KITSON, K. E.; TWEEDIE, J. W. *et al.* Gamma-glutamyl transpeptidase inhibition suppresses milk protein synthesis in isolated ovine mammary cells. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 321-329, 2004.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Patology of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic press, 1993. 3p.

JUNAIDU, A. U.; SALIHU, F. M.; TAMB UWAL, F. M. *et al.* Prevalence of mastites in lactating cows in some selected commercial dairy farms in sokoto metropolis. *Pelagia Research Library*, v. 2, n. 2, p. 290-294, 2011.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, p. 203–216, 2012.

KEHRLI, M. E.; SHUSTER, D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 619-627, 1994.

KENNY, A. J. γ -glutamyl transferase (γ -glutamyl transpeptidase). In: BARRETT, A. J. (Ed.) *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1977. p. 410-417.

KENNY, K. P.; TOLLERSRUD, T.; BASTIDA-CORCUERA, F. D. The enhancement of bovine mammary gland immunity through vaccination. In: ANDREWS, A. H. (Ed.) *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. 2. ed. Austrália: Blackwell – Science, 2004. p.379-390.

KELLY, A. L.; TIERNAN, D.; O'SULLIVAN, C. *et al.* Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 300-304, 2000.

KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: a review. *Veterinary Quarterly*, v. 24, p. 181-198, 2002.

KIERMEIER, F.; MEINL, E. Zur kenntnis de milchphosphatasen. II ve rhalten der sauren phosphatase neber der alkalischen in kulmilch. *Z. Lebensn uters forsch*, v. 114, p. 189-202. 1961.

KIRCHGESSNER, M.; FRIESCKE, H.; KOCH, G. *Nutrition and the composition of milk*. London: Crosby Lookwood, 1967.129p.

- KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v. 48, p.167-188, 1981.
- KITCHEN, B. J.; TAYLOR, G. C.; WHITE, I. C. Milk enzymes – their distribution and activity. *Journal of Dairy Research*, v. 37, p. 279-288, 1970.
- KORNALIJNSLIJPER, E.; BEERDA, B.; DAEMEN, I. *et al.* The effect of milk production level on host resistance of dairy cows, as assessed by the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research*, v. 34, p. 721, 2003.
- LADEIRA, S. R. L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. *Doenças de ruminantes e equinos*. 2.ed. São Paulo: Editora Varela, 2001. p. 300.
- LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite b no estado de São Paulo. *Scientia Agricola*, v. 51, n. 3, p. 578-585, 1994.
- LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J. R. *et al.* Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, v. 329, p. 849-857, 2006.
- LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal*, v. 157, p. 225, 1999.
- LIBERA, A. M. M. P. D.; ARAUJO, W. P.; KITAMURA, S. S. *et al.* Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p.1087-1092, 2004.
- LIN, M. J.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Measurement of ionic calcium in milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n. 3, p. 192-199, 2006.
- LINDEN, G.; ALAIS, C. Alkaline phosphatase in human, cow and sheep milk: molecular and catalytic properties and metal ion action. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, v. 18, p. 749-758, 1978.
- LINDEN, G.; MAZERON, P.; MICHOLOWSKI, J. B. *et al.* Phosphatase alcaline du lait de vache. Purification et propriétés moléculaires. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 358, p. 82-90, 1974.
- LOHUIS, J. A.; VAN LEEUWEN, W.; VERHEIJDEN, J. H. *et al.* Flunixin meglumine and flurbiprofen in cows with experimental *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research*, v. 124, p. 305, 1989.
- MAGALHÃES, H. R.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L. *et al.* Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.
- MAGNUSSON, M.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. *et al.* *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 5473-5482, 2007.
- MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L. *et al.* Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.
- McKELLAR, R. C.; MODLER, H. W.; COUTURE, H. *et al.* Predictive modeling of alkaline phosphatase inactivation in a high temperature short time pasteurizer. *Journal of Food Protection*, v. 57, p. 424-430, 1994.
- McLENNAN, M. W.; KELLY, W. R.; O'BOYLE, D. *Pseudomonas* mastitis in a dairy herd. *Australian Veterinary Journal*, v. 75, n. 11, p. 790-792, 1997.
- MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Veterinary Research*, v. 36, n. 1, p. 101-116, 2005.
- MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; PYÖRÄLÄ, S. *et al.* Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 3268-3276, 2002.

- MENZIES, F.D.; GORDON, A.W.; MCBRIDE, S.H. *et al.* Risk factors for toxic mastitis in cows. *Veterinary Record*, v.152, p.319-322, 2003.
- MENZIES, F. D.; MCBRIDE, S. H.; MCDOWELL, S. W. *et al.* Clinical and laboratory findings in cases of toxic mastitis in cows in Northern Ireland. *Veterinary Research*, v. 147, p. 123, 2000.
- MEOTTI, F. C. Laboratório de pesquisa em processos redox na resposta inflamatória. Acesso em: 27 nov 2013. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/flaviam/>
- MILLER, R. H.; PAAPE, M. J.; FULTON, L. A. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3782-3790, 1991.
- MIN, B. Basophils: what they ‘can do’ versus what they ‘actually do’. *Nature Immunology*, v. 9, p. 1333-1339, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA. Projeções do agronegócio. Brasil 2011/12 a 2021/22 Projeções de Longo Prazo. Acesso em: 10 jan 2013. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES-web.pdf
- MILKPOINT. Acesso em: 10 jan 2013. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/fao-preve-aumento-de-3-na-producao-global-de-leite-em-2012-81388n.aspx>
- MOGES, N.; ASFAW, Y.; BELIHU, K. A cross sectional study on the prevalence of sub clinical mastites and associated risk factors in and gandar, northern Ethiopia. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 3, n. 6, p. 455-459, 2011.
- MORIN, D. E. Mammary gland health and disorders In: SMITH, B. P. *Large animal internal medicine*. 4. ed. Elsevier, 2009. 1112-1143p.
- MORSI, N. M.; GAZZAR, H. E.; SALEH, Y. *et al.* Effect of mastitis on milk lactose, chloride and koestler’s number. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 3, n. 1, p. 20-23, 2000.
- MULLAN, N. A.; CARTER, E. A.; NGUYEN, K. A. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. *Research in Veterinary Science*, v. 38, n. 2, p. 160-166, 1985.
- MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, v. 176, p. 3-9, 2008.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Janeway’s Immunology*. 7. ed. New York: Garland Science, 2008. 555-598p.
- NATZKE, R. P.; EVERETT, R. W.; POSTLE, D. S. Normal milk somatic cell counts. *Journal milk food technology*, v. 35, p. 261-263, 1972.
- NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G. *et al.* Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *Journal of Dairy Science*, v.52, p.696-707, 1969.
- NEESSER, N. L.; HUESTON, W. D.; GOODEN, S. M. *et al.* Evaluation of the use an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.228, p.254-260, 2006.
- NIELEN, M.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta-analysis of mastitis detection performance. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 606, 1992.
- 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 JÚNIOR M. B.; VANDERLEI, D. R.; MORAES, W. S. *et al.* Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.5, p.391-395, 2012.
- O’MAHONY, J. A.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes of milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.)

Advanced Dairy Chemistry: v-1a: Proteins: Basic Aspects. 4. ed. New York: Springer Science, 2013. p. 337-385.

ONTSOUKA, C. E.; BRUCKMAIER, R. M.; BLUM, J. W. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 2005-2011, 2003.

OSBORNE, A. D.; ARMSTRONG, K.; CATRYSSSE, N. H. *et al.* Na outbreak of *Pseudomonas* mastitis in dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 22, v. 22, p. 215-217, 1981.

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

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X. *et al.* The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, v. 34, n. 5, p. 597-627, 2003.

PAAPE, M. J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A. *et al.* Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 84, suppl. E, p. 237-244, 2001.

PAES, P. R. O.; LOPES, S. T. A.; LOPES, R. S. *et al.* Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 1, 2003.

PARK, Y. K.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J. *et al.* Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 998-1006, 1992.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H. *et al.* The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 5405-5414, 2007.

PERO, M. E.; MIRABELA, N.; LOMBARDI, P. *et al.* Gammaglutamyltransferase activity in

buffalo mammary tissue during lactation. *Animal Science*, v. 82, v. 351-354, 2006.

PHUEKTES, P.; BROWNING, G. F.; ANDERSON, G. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *Journal of Dairy Research*, v. 70, p. 149-155, 2003.

PILLA, R.; SCHWARZ, D.; KÖNIG, S.; PICCININI, R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 4410-4420, 2012.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B. *et al.* Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 2933-2944, 2011.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *Journal of the Infectious Diseases*, v. 7, p. 663-664, 1910.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. *Obstetrícia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 97-99p.

QUEIROZ, A. M.; VIEIRA, E. R.; CAMPOS, F. R. *et al.* A pecuária leiteira em Goiás nos últimos anos. Acesso em: 07 jan 2013. Disponível em: <http://www.seplan.go.gov.br/sepin/pub/conj/conj15/artigo08.pdf>

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; COUTER, M. E. *et al.* *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 451-460p.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. *et al.* *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9.ed. London: W.B. Saunders, 2000. 603-700p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. *et al.* *Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e*

- equinos*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
- RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. *et al. Veterinary Medicine*. 10. ed. London: Elsevier, 2007. 673-696p.
- RAINARD, P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*, v. 34, n.5, p. 647-670, 2003.
- RAINARD, P.; CORRALES, J. C.; BARRIO, M. B. *et al.* Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of Luk M/LukF⁺-PV leukotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10, p. 272-277, 2003.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development*, v. 43, n. 5, p. 439-457, 2003.
- RAMBEAUD, M.; ALMEIDA, R. A.; PIGHETTI, G. M. *et al.* Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 96, p. 193-205, 2003.
- RIBAS, N. P. Importância da contagem de células somáticas (CCS) para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE, 1999, Maringá. *Anais...* Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1999. p.13-19.
- ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary clinics of North America: Food Animal*, n. 28, p. 271-288, 2012.
- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D. *et al.* Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 958, 1994.
- RODRÍGUEZ, E. M. R.; ALAEJOS, M. S.; ROMERO, C. D. Mineral concentrations in cow's milk from the canary island. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, p. 419-430, 2001.
- ROHDE, H.; BURANDT, E. C.; SIEMSEN, N. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, v. 28, p. 1711-1720, 2007.
- ROSENTHAL, I. *Milk and dairy products: properties and processing*. Weinheim: VCH, 1991. 5p.
- SANT'ANA, V. A. C. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. 2004. 161f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. (Eds) *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
- SARGEANT, J. M.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E. *et al.* Sensitivity and specificity of somatic cell count and california mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2018, 2001.
- SARIKAYA, H.; PRGOMET, C.; PFAFFL, M. W.; BRUCKMAIER, R. M. Differentiation of leukocytes in bovine milk. *Milchwissenschaft – milk science international*, v. 59, n. 11/12, p. 581-696, 2004.
- SARIKAYA, H.; SCHLAMBERGER, G.; MEYER, H. H. D. *et al.* 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, p. 2479-2486, 2006.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis

Test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.130, p.199-204, 1957.

SCHEPERS, A.J.; LAM, T.J.G.M. *et al.* Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.1833-1840, 1997.

SCHROEDER, J. W. Mastitis Control Programs Bovine Mastitis and Milking Management (2012). Acesso em: 11 fev. 2013.

Disponível em:
<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf>

SCHWARTZ, D.; DIESTERBECK, U. S.; KÖNIG, S. *et al.* Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 5033-5044, 2011a.

SCHWARTZ, D.; DIESTERBECK, U. S.; KÖNIG, S. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 448-455, 2011b.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-SEBRAE. Conhecer –Leite e derivados N. 17, p.5, dezembro 2010. Acesso em:10 jan 2013. Disponível em:
[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/C27EFC1D47AAEFC78325786F0044B33A/\\$File/NT00045502.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/C27EFC1D47AAEFC78325786F0044B33A/$File/NT00045502.pdf)

SHAKEEL-UR-REHMAN, F.; FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Indigenous phosphatases in milk. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry-Proteins*. New York: KluwerAcademic-Plenum Publishers, 2003. p. 523-543.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and Differential Cell Counts in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Buffalo Journal*, v. 2, p. 133-137, 1994.

SILVA, L. A. F.; SILVA, E. B.; SILVA, L. M. *et al.* Causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras adultas. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.5, n.1, p.9-17, 2004.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N. *et al.* 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.

SINGH, L. N.; GANGULI, N. C. A comparative appraisal of certain enzymes in abnormal bovine Milk. *National Dairy Research Institute*, v. 28, p. 67-68, 1975.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, v. 68 p. 1531-1553, 1985.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C. *et al.* Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

STOCKHAN, S. L.; SCOTT, M .A. *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 533-561p.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 40, p. 79-89, 1994.

TAKAHASHI, H.; KOMATSU, T.; HODATE, K. *et al.* Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 52, p. 32-37, 2005.

TAMIME, A. Y. *Milk processing and quality management*. Ayr: Black well publishing. 2009. p. 23-43, 294-313.

- TASSELL, J. A.; MARTIN, N. H.; MURPHY, S. C. *et al.* Evaluation of various selective media for the detection on *Pseudomonas* species in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 1568-1574, 2012.
- TATE, S. S.; MEISTER, A. Subunit structure and isozymic forms of γ -glutamyl transpeptidase. *Proceedings of the National Academy Science*, v. 73, p. 2599-2603, 1976.
- TATLOCK, J. H.; LINTON, M. A.; HOU, X. J. *et al.* Structure-based design of novel calcineurin (PP2B) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, p. 1007-1012, 1997.
- TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J. *et al.* Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in brandenburg, Alemanha. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2542-2551, 2006.
- THE IDENTITY OF THE INTERNATIONAL FARM COMPARISON NETWORK-IFCN. Acesso em: 07 jan de 2013. Disponível em: <http://www.ifcndairy.org/media/bilder/inhalt/News/DR2012/IFCN-Dairy-Report-2012-press-release-corrected.pdf>
- THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. *Milk Proteins from Expression to food*. London: Elsevier, 2009. 535p.
- THORBERG, B. M.; DANIELSSON-THAM, M. L.; EMANUELSON, U. *et al.* Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 4962-4970, 2009.
- TINÔCO, A. L. A. *et al.* Análises das condições físico-químicas do leite oferecido ao comércio em Viçosa - MG. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 98, p. 101-106, 2002.
- TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland, *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 2366, 1995.
- TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. *et al.* Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 184, 1991.
- TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P. *et al.* Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 234-246, 2013.
- TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 5012-5017, 2007.
- VIÑA, J. R.; GARCIA, C.; BARBER, T. Regulation of amino acid metabolism during lactation. *Recent Research Developments in Nutrition*, v. 4, p. 101-111, 2001.
- VIÑA, J. R.; PALACIN, M.; PUERTES, I. R. *et al.* Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *American Physiological Society*, v. 257, p. 916-922, 1989.
- VOGES, O.; PROSKAUER, B. Beitrage zur Ernährungsphysiologie und zur differential diagnose der Bakterien der hemmorrhagischen septicämie. *Zeit fur Hygiene*, v. 28, p.20-32, 1898.
- VOLPE, S. L. Magnesium. In: BOWMAN, B. A.; RUSSELL, R. M. (Eds.) *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: International Life Sciences Institute, 2006. p. 400-408.
- WALLACE, R. L. Bacteria counts in raw milk. Acesso em: 26 ago. 2013. Disponível em: <http://www.livestocktrail.illinois.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=9957>
- WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B. *et al.* Differentiation of bacteremic and non-bacteremic cows with acute coliform mastitis. In: THE 17TH AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 1999, Chicago. *Proceedings of the 17th American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, Chicago, 1999. 693p.
- WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B. *et al.* Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 218, p. 567, 2001.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B. *et al.* Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 219, p. 976-981, 2001.

WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; BARRINGTON, G. M. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 229, p. 259-262, 2006.

YUAN-YUAN, C.; ZHENG-TAO, Y.; WEN-BO, L. *et al.* Prevalence and major Pathogen causes of dairy cows subclinical mastitis in northeast china. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 11, n. 8, p. 1278-1280, 2012.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA, J. V. *et al.* Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite

subclínica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.

ZANKER, I. A.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W. Activities of γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase and aspartate-aminotransferase in colostrum, milk and blood plasma of calves fed first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 and 24-25h after birth. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 48, p. 179-185, 2001.

ZARRILLI, A.; MICERA, E.; LACARPIA, N. *et al.* Evaluation of ewe colostrum quality by estimation of enzyme activity levels. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 154, n. 8-9, p. 521-523, 2003.

ZIV, G.; SHEM-TOV, M.; ASCHER, F. Combined effect of ampicillin, colistin and dexamethasone administered intramuscularly to dairy cows on the clinico-pathological course of *E. coli*-endotoxin mastitis. *Veterinary Research*, v.29, n.1, p.89-98, 1998.