NARA LADEIRA DE CARVALHO

**Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia
da polimerase**

Pirassununga

2013

NARA LADEIRA DE CARVALHO

Deteção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2839
FMVZ

Carvalho, Nara Ladeira de
Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase / Nara Ladeira de Carvalho. -- 2013.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. *Streptococcus agalactiae*. 2. Diagnóstico. 3. Cultura microbiológica. 4. qPCR. 5. Leite de vaca e de tanque. I. Título.

ERRATA

CARVALHO, N. L. **Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase.** 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	1º	67 f.	68 f.
ABSTRACT	1º	67 f.	68 f.
LISTA DE TABELAS	1º	Tabela 1 – Contagem de <i>S. Agalactiae</i> em amostras individuais de leite de vacas (n=26) e Ct pela metodologia de qPCR e por cultura microbiológica.....45	Tabela 1 – Contagem de <i>S. Agalactiae</i> em amostras individuais de leite de vacas (n=26) e Ct pela metodologia de qPCR e por cultura microbiológica.....43
	2º	Tabela 2 – Contagem de <i>S. Agalactiae</i> em leite de tanque (n=38) e Ct pela metodologia de qPCR e cultura microbiológica47	Tabela 2 – Contagem de <i>S. Agalactiae</i> em leite de tanque (n=38) e Ct pela metodologia de qPCR e cultura microbiológica44

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite pela reação em cadeia da polimerase", protocolado sob o nº 2608/2012, utilizando amostras de leite, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 12/12/2012.

We certify that the Research "Detection and counting of *Streptococcus agalactiae* in milk by polymerase chain reaction", protocol number 2608/2012, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/12/2012.

São Paulo, 17 de dezembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: CARVALHO, Nara Ladeira

Título: **Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Fábio, Neida e Fabiana,

que são a minha

razão de tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir chegar onde estou nesse momento;

A meus pais pelo apoio, suporte, carinho e todo amor do mundo;

À minha irmã que sempre esteve ao meu lado de todas as formas possíveis, me ajudando a me tornar uma pessoa melhor;

À toda equipe do laboratório Qualileite, em especial Lú e Zeca, pelo apoio e orientações praticamente paternas;

À Universidade de São Paulo;

Aos amigos que fiz aqui, Daniele, Paula, Susana, Camila, Cris, Bruno, Juliano, Juliana, Marquinhos, Aline, Alessandra, Cristian, Bárbara, Tiago e Marina;

Ao Bruno pelo incentivo constante, palavras positivas e enorme ajuda;

Ao professor Luis Felipe, por toda a ajuda e esclarecimentos tão importantes.

À Lígia Mesquita que foi peça fundamental no desenvolvimento de várias atividades com extrema paciência e amizade.

Ao professor Marcos Veiga, pela orientação, extrema paciência, compreensão e dedicação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma me ajudaram e eventualmente tenha esquecido de mencionar.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Hey you, don't tell me there's no hope at all,
together we stand, divided we fall”
(Roger Waters)

RESUMO

CARVALHO, N. L. **Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase.** [Detection and counting of *Streptococcus agalactiae* in bovine milk by polymerase chain reaction]. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo do presente estudo foi: a) comparar dois métodos de detecção e contagem de *S. agalactiae*, (cultura microbiológica e qPCR) em leite de vacas e de tanques; b) determinar a sensibilidade analítica e a repetibilidade do diagnóstico por qPCR em relação à cultura microbiológica para detecção de *S. agalactiae* em amostras compostas de leite de vaca e de tanque. Foram utilizadas amostras de leite de vaca (n=31) e de tanque (n=150), as quais foram submetidas à cultura microbiológica e contagem de *S. agalactiae* por cultura de microbiologia convencional e qPCR. Para avaliar a sensibilidade analítica, foi construída uma curva padrão com amostras de leite desnatado reconstituído estéril contaminado artificialmente com *S. agalactiae* (ATCC – 13813). Em apenas duas amostras não foi possível amplificação de DNA, o que indica que a qPCR foi capaz de detectar *S. agalactiae*, em 96% e 97%, do leite de vaca e de tanque, respectivamente. Embora a técnica qPCR tenha apresentado alta sensibilidade analítica, não houve equivalência de resultados de contagem *S. agalactiae* entre os dois métodos propostos. Os coeficientes de variação interensaio utilizados para avaliar a técnica qPCR foram < 5%, o que demonstra que a técnica possui repetibilidade adequada. Portanto, não houve equivalência entre a contagem de *S. agalactiae* por cultura microbiológica padrão e a técnica de qPCR, provavelmente pela alta sensibilidade da técnica qPCR em quantificar DNA de células inviáveis. No entanto, a qPCR apresentou-se como uma técnica sensível para identificação de *S. agalactiae* em amostras de leite de vaca e de tanque.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, Diagnóstico, Cultura microbiológica, qPCR,
Leite de vaca e de tanque.

ABSTRACT

CARVALHO, N. L. **Detection and counting of *Streptococcus agalactiae* in bovine milk by polymerase chain reaction.** [Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase]. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The aim of this study was to: a) to compare two methods of detection and enumeration of *S. agalactiae* (microbiological culture and qPCR) in cow's milk and bulk tank milks, b) to determine the analytical sensitivity and repeatability of the diagnosis by qPCR in relation to microbiological culture for detection of *S. agalactiae* on composite samples of cow's milk and bulk tank milk. Samples of cow's milk (n = 31) and bulk tank milk (n = 150), which were submitted to microbiological culture and enumeration of *S. agalactiae* by conventional microbiology culture and qPCR. To evaluate the analytical sensitivity, a standard curve was made with samples of sterile reconstituted skim milk artificially contaminated with *S. agalactiae* (ATCC - 13813). In two samples was not possible the amplification of DNA, indicating that qPCR was able to detect *S. agalactiae*, 96% and 97% cow's milk and bulk tank milk, respectively. Although the technique has presented qPCR high analytical sensitivity, there was no equivalent result of counting *S. agalactiae* between the two proposed methods. The interassay coefficients of variation technique used to evaluate the qPCR were <5%, which demonstrate that the technique has adequate repeatability. So there was no equivalence between the counts of *S. agalactiae* by standard microbiological culture and qPCR technique, probably due to the high sensitivity of qPCR technique to quantify DNA of unviable cells. However, the qPCR presented as a sensitive technique for identifying *S. agalactiae* in samples of cow's milk and bulk tank milk.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, Diagnosis, Microbiological culture, qPCR, Milk of cows, Bulk tank milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônias típicas de <i>Streptococcus</i> spp.	32
Figura 2 - Colônias típicas de <i>S. agalactiae</i> em meio seletivo Edwards sangue.	33
Figura 3 - Esquema de diluição seriada de leite em solução salina 0,9%.	34
Figura 4 - Esquema de diluição seriada de cepa ATCC <i>S. agalactiae</i> em leite desnatado em pó reconstituído estéril.	36
Figura 5 - Esquema de simplificado do cálculo do coeficiente de variação (CV) intra-ensaio e interensaio.	40
Figura 6 - Correlação ($r = 0,971$; $P < 0,001$) entre os resultados de contagem (UFC/ml) de <i>S. agalactiae</i> ATCC 13813, de quatro diluições (10-5 até 10-7), e de Ct oriundos da técnica de qPCR (Ct). Os dados (UFC/mL e Ct) foram expressos em escala logarítmica de base 10. ($\log_{10}\text{UFC} = 14,954 - (0,3783 * \log_{10}\text{Ct})$). $r = 0,97$	46
Figura 7 - Correlação ($r = 0,792$; $P < 0,001$) entre os resultados de quantificação de DNA do <i>S. agalactiae</i> ATCC 13813 por qPCR (Ct), de dez diluições seriadas em água nucleasse free, e concentração de DNA estimado pelo valor da potência da diluição. de Ct oriundos da técnica de qPCR (Ct). Os dados (Ct e concentração) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da concentração de DNA de <i>S. agalactiae</i> , a partir da amplificação do DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR é $\log_{10}\text{Conc DNA} = 19,391 - (9,8178 * \log_{10}\text{Ct})$	48
Figura 8 - Representação gráfica da reação de qPCR para avaliação da variável Ct, em diferentes concentrações de DNA submetidos a dez diluições seriadas.	48
Figura 9 - Correlação ($r = 0,462$; $P = 0,245$) da contagem de <i>S. agalactiae</i> (n= 25) e Ct por meio da técnica qPCR. Os dados (UFC e Ct) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da UFC/mL de <i>S. agalactiae</i> a partir da amplificação de DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR é $\log_{10}\text{UFC} = 0,0045 * (\log_{10}\text{C})^2 - (0,3555 * \log_{10}\text{Ct}) + 8,7831$	49
Figura 10 - Correlação ($r = 0,2951$; $P = 0,0091$) da contagem de <i>S. agalactiae</i> (n= 37) e Ct por meio da técnica qPCR. Os dados (UFC e Ct) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da contagem de <i>S. agalactiae</i> a partir da amplificação de DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR foi $\log_{10}\text{UFC} = 7,0393 - (0,1279 * \log_{10}\text{Ct})$	50

- Figura 11 - Identidade entre as contagens de *S. agalactiae* (em log10UFC/mL) obtidas pelos métodos de qPCR [(UFC/mL) estimado] e de referência [(UFC/ml) medido]. 52
- Figura 12 - Média entre os resultados de contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) em função das diferenças observadas entre os resultados obtidos pelos dois métodos (ambos em log10UFC/mL). O Bias (0,86) é a diferença média entre os valores de UFC/ml por ambos métodos e os valores limites de concordância entre eles variaram de -2,90 a 1,17. 53
- Figura 13 - Gráfico de identidade entre as contagens de *S. agalactiae* (em log10UFC/mL) obtidas pelos métodos de qPCR [(UFC/ml) estimado] e de referência [(UFC/ml) medido]. 54
- Figura 14 - Representação gráfica da média entre os resultados de contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) de em função das diferenças observadas entre os resultados da contagem do patógeno obtidos pelos dois métodos (ambos em log10UFC/mL). O Bias (2,80) é a diferença média entre os valores de UFC/mL por ambos métodos e os valores limites de concordância entre eles variaram de -5,49 a - 0,11..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de <i>S. agalactiae</i> em amostras individuais de leite de vacas (n=26) e Ct pela metodologia de qPCR e por cultura microbiológica.	45
Tabela 2 - Contagem de <i>S. agalactiae</i> em leite de tanque (n=38) e Ct pela metodologia de qPCR e cultura microbiológica	47
Tabela 3 - Amostras e testes utilizados para quantificação de DNA após processo de extração..	45
Tabela 4 - Contagem média de <i>S. agalactiae</i> em leite contaminado artificialmente.	47
Tabela 5 - Repetibilidade da técnica qPCR calculado por meio dos coeficientes de variação intra e interensaio.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IIM	Infecção intramamária
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CCS	Contagem de células somáticas
CBT	Contagem bacteriana total
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
UFC	Unidades formadoras de colônias
μL	Microlitros
BTM	Bulk Tank Milk (Leite de Tanque)
DNA	Deoxyribonucleic acid
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
Ct	Cycle threshold
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CV	Coefficiente de variação
IC	Intervalo de confiança
r	Coefficiente de correlação
BMCB	Gene codificador do citocromo B mitocondrial bovino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MASTITE BOVINA	18
2.1.1	Definições sobre a mastite bovina	18
2.1.2	Tipos de mastite quanto a forma de manifestação	18
2.1.3	Classificação dos patógenos causadores de mastite bovina	19
2.1.4	Prevalência de patógenos causadores de mastite bovina	20
2.1.5	Custos associados a mastite bovina	20
2.2	DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA	21
2.2.1	Coleta de amostras individuais de leite de vaca	22
2.2.2	Coleta de amostras de leite de tanque	22
2.2.3	Contagem de células somáticas	23
2.2.4	Contagem bacteriana total	25
2.2.5	Técnicas de diagnóstico microbiológico da mastite	26
2.2.5.1	Cultura microbiológica	26
2.2.5.2	Metodologias de semeadura em placa	27
2.2.5.3	Técnica de biologia molecular por PCR em tempo real	28
2.3	MASTITE BOVINA CONTAGIOSA POR <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	SELEÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE	31
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. AGALACTIAE</i> POR CULTURA MICROBIOLÓGICA	31
3.2.1	Leite de vaca	31
3.2.2	Leite de tanque	32
3.3	CONTAGEM DE <i>S. AGALACTIAE</i> POR CULTURA MICROBIOLÓGICA	33
3.3.1	Técnica da diluição seriada para quantificação de <i>S. agalactiae</i>	33
3.3.2	Técnica de quantificação de DNA bacteriano pela qPCR	35
3.3.2.1	Construção da curva de quantificação	35
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3.4.1	Correlações estatísticas	39
3.4.2	Determinação da sensibilidade analítica e da repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR	39

3.4.3	Análise da equivalência entre os métodos de quantificação.....	41
4	RESULTADOS	42
4.1	IDENTIFICAÇÃO DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS DE LEITE E DE TANQUE.....	42
4.2	CURVA PADRÃO DE CONTAGEM DE <i>S. AGALACTIAE</i> (ATCC 13813).....	42
4.2.1	Amostras individuais de leite e de tanque	43
4.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO PELA QPCR	45
4.3.1	Quantificação de DNA após processo de extração.....	45
4.3.2	Construção da curva padrão de <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813.....	46
4.3.3	Leite de amostras individuais de vaca e de tanque	47
4.4	Correlação entre o valor de Ct e concentração de DNA.....	48
4.5	CORRELAÇÃO ENTRE CT E CONTAGEM DE <i>S. AGALACTIAE</i> (UFC/ML) DAS AMOSTRAS DE LEITE DE VACA	49
4.6	CORRELAÇÃO ENTRE CT E CONTAGEM DE <i>S. AGALACTIAE</i> EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE.....	49
4.7	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA E DA REPETIBILIDADE DO PROCEDIMENTO DIAGNÓSTICO POR QPCR PARA A DETECÇÃO DE <i>S. AGALACTIAE</i>	50
4.8	EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE REFERÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO <i>STREPTOCOCUS AGALACTIAE</i> EM AMOSTRAS DE LEITE.....	52
4.8.1	Amostras de leite de tanque	52
4.8.2	Amostras de leite de vaca	54
5.	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Streptococcus agalactiae é um dos principais agentes etiológicos de infecções intramamárias (IIM), e é considerado um patógeno obrigatório da glândula mamária (KEEFE, 1997; BRITO et al., 1998). Vacas infectadas por *S. agalactiae* atuam como reservatório do agente por apresentarem baixa taxa de cura espontânea (Keefe, 1997). *S. agalactiae* está associado com o aumento de contagem bacteriana total (CBT) e da contagem de células somáticas (CCS) do leite de vacas (COSTA et al., 1995).

Uma alternativa aos diagnósticos individuais da mastite é o uso da cultura de amostras do leite total do rebanho (amostras de tanque), que tem sido usada para o monitoramento de patógenos contagiosos da mastite; entre os quais *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (BRITO et al., 1998). Os micro-organismos podem se originar a partir de úbere de vacas com mastite, da superfície externa dos úberes e dos tetos, ou de uma variedade de outras fontes do ambiente da fazenda (BRITO et al., 2000). A presença de *S. agalactiae* em amostras de leite do tanque indica que este micro-organismo foi eliminado a partir de quartos mamários, pois o único reservatório deste micro-organismo é o úbere (BRITO et al., 1999).

A cultura do leite de tanque é uma ferramenta importante para avaliar a qualidade do leite (JARAYAO et al., 2004; ZADOKS et al., 2005;), visto que a prevalência de mastite e o perfil dos agentes causadores de infecção da glândula mamária influencia a qualidade do leite produzido (BRITO et al., 1998). Entretanto, a avaliação das amostras individuais de vaca despende maior tempo quando o objetivo é o monitoramento da presença de patógenos no rebanho (KEEFE, 1997; JARAYAO et al., 2004). Além disso, a metodologia de cultura de leite de tanque apresenta menor custo e é demanda menor trabalho laboratorial (BRITO BRITO, 1998; JAYARAO, WOLFGANG, 2003). No entanto, a cultura microbiológica para identificação e contagem de patógenos causadores de mastite, considerada a metodologia de referência, demanda maior tempo para diagnóstico, levando em média 2 a 3 dias (BRITO, BRITO, 1998). Para reduzir o tempo de análise e aumentar a sensibilidade de detecção, metodologias de maior sensibilidade e velocidade de diagnóstico (KATHOLM et al., 2012) foram propostas para a detecção e quantificação dos patógenos causadores de IIM (ELIAS et al., 2012), como a técnica de PCR em tempo real ou qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) (KOSKINEN et al., 2009).

A hipótese do presente estudo foi a de que a PCR em tempo real pode ser empregada para identificação e contagem de *S. agalactiae* em amostras individuais e de leite de tanque e

se há equivalência com a metodologia de referência (cultura microbiológica). O objetivo geral do presente estudo foi comparar dois métodos de detecção e contagem de *S. agalactiae* (cultura microbiológica e qPCR), em amostra de leite vacas individuais e de tanques de rebanhos leiteiros. Adicionalmente, objetivou-se avaliar a sensibilidade analítica e a repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR em relação à cultura microbiológica para contagem de *S. agalactiae* em amostras individuais e de leite de tanque.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE BOVINA

2.1.1 Definições sobre a mastite bovina

A mastite é a inflamação da glândula mamária, de caráter multifatorial e por isso, é doença de difícil controle (OVIEDO BOYSO et al., 2007). Além disso, apresenta alta prevalência no gado leiteiro e é umas das doenças mais importantes por causar impactos negativos a indústria leiteira (OVIEDO BOYSO et al., 2007). Esta enfermidade é caracterizada por mudanças físicas e químicas no leite resultante de trauma ou lesão do úbere, irritação química, ou a partir de infecção, principalmente, causada por diferentes espécies bacterianas (GRUET et al., 2001; BRADLEY, 2002; WELLENBERG et al., 2002). Quando as bactérias invadem a glândula mamária via canal do teto e se multiplicam no epitélio secretor, uma infecção intramamária (IIM) pode se estabelecer, e provocar resposta inflamatória com ou sem sinais clínicos (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; DE VLIEGER et al., 2012).

2.1.2 Tipos de mastite quanto a forma de manifestação

Quanto à forma de manifestação, a mastite pode ser classificada como subclínica (ausência de sintomas visíveis) ou clínica (sintomas visíveis) (DE VLIEGHER et al., 2012). A mastite clínica ocorre quando há alterações visíveis no animal ou no leite, como por exemplo, edema, endurecimento e sensibilidade aumentada do úbere, bem como aumento da temperatura corporal, enquanto que no leite pode ser percebida a presença de grumos, pus, sangue ou outras alterações. Embora a mastite subclínica não ocasione sintomatologia ao animal, alterações ocorrem na produção, composição do leite e CCS. A mastite subclínica apresenta maior prevalência quando comparado à mastite clínica, sendo desta forma

considerada em média responsável por 90 a 95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros, e cercas de 15 a 40 vezes mais frequente que a forma clínica (SANTOS, FONSECA, 2007).

2.1.3 Classificação dos patógenos causadores de mastite bovina

Os micro-organismos causadores de mastite são classicamente divididos em espécies contagiosas e ambientais, sendo que esta distinção é feita de acordo com o modo de transmissão destes patógenos no rebanho (SCHUKKEN et al., 2012). Os micro-organismos contagiosos são caracterizados pela transmissão de vaca para vaca, enquanto os ambientais são caracterizados pela transmissão do ambiente para a vaca (BRADLEY, GREEN, 2005). De forma geral, os patógenos contagiosos são mais adaptados ao animal e causam infecções subclínicas, enquanto os patógenos ambientais são considerados oportunistas por causarem casos graves de IIM (SCHUKKEN et al., 2012). Adicionalmente, os patógenos causadores de mastite podem ser também classificados como principais e secundários, com base no grau de patogenicidade. Sendo assim, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae*, induzem resposta imunológica de aumentada CCS, ao contrário dos patógenos secundários, *Corynebacterium* spp. e as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (BRADLEY, GREEN, 2005). Além destes micro-organismos, *Prototeca* spp. e *Mycoplasma* spp., recentemente, tem sido reconhecidos como patógenos principais causadores de mastite (SCHUKKEN et al., 2012).

Por outro lado, Schukken et al. (2012) descreveram que micro-organismos causadores de mastite podem se comportar tanto como patógenos contagiosos, quanto ambientais. Além disso, estes pesquisadores sugeriram que para classificação entre mastite ambiental ou contagiosa, alguns critérios seriam necessários: dados relacionados à saúde do úbere do rebanho (a exemplo, CCS), avaliação dos fatores de risco associados à saúde do úbere e os perfis das espécies causadoras de mastite que podem ser realizados por técnicas de biologia molecular (a exemplo, a técnica PFGE) (SCHUKKEN et al., 2012).

2.1.4 Prevalência de patógenos causadores de mastite bovina

A maioria das IIM (>75%) são causadas por *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (WILSON et al., 1997). Entretanto, a prevalência dos micro-organismos na propriedade leiteira pode variar, em razão da sazonalidade, tipo de manejo, taxa de cura que está diretamente relacionado à espécie bacteriana e resposta imune da vaca, e a fase de lactação, que são alguns dos principais fatores que interferem no percentual dos patógenos causadores de mastite (MAKOVEC; RUEGG, 2003).

Wilson et al. (1997) avaliaram amostras de leite de vacas acometidas pela mastite subclínica e descreveram maior prevalência para *Staphylococcus* spp. (11,3%), *Streptococcus agalactiae* (10,1%), *Staphylococcus aureus* (9,1%) e *Streptococcus* spp. (7,3%). Por outro lado, foi descrito por Makovec e Ruegg (2003) que amostras de leite de vacas acometidas pela mastite subclínica tinha maior prevalência para *Staphylococcus* spp. (13,2%), *Streptococcus* spp. (12,2%), *Staphylococcus aureus* (9,7%) e *Streptococcus agalactiae* (4,1%). Recentemente, Ferguson et al. (2007) descreveram maior prevalência para *Staphylococcus aureus* (22,6%), *Staphylococcus* spp. (20,6%), *Streptococcus* spp. (11,1%), e *Streptococcus agalactiae* (2,3%). A redução de frequência de *S. agalactiae* ao longo de 10 anos, provavelmente aconteceu pelo alto percentual de cura próximo a 90% deste micro-organismo frente à antibioticoterapia (NMC, 1996; GRUET et al., 2001).

Embora tenha diminuído o percentual de mastite causada por *S. agalactiae* em alguns países, no Brasil este patógeno continua a ser um dos mais importantes agentes de mastite bovina, tendo sido isolado de diferentes regiões do País em porcentagens que variaram de 3,2% a 33% (SANTOS et al., 2006).

2.1.5 Custos associados a mastite bovina

A mastite é uma importante causa de perdas econômicas aos produtores de leite pela redução na produção leiteira e da qualidade do leite, descarte de leite com resíduos de antibióticos, o aumento do uso de antibióticos para tratamentos, mão de obra e serviços veterinários (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; LOPES et al., 2011). Adicionalmente, a mastite

pode diminuir a capacidade de produção de leite do tecido secretor mamário de forma irreversível, o que consequentemente reduz a média de produção de leite por animal na lactação subsequente, e descarte de vacas em alguns casos (HOGVEEN et al., 2011). Além da redução da produção de leite, também ocorre diminuição dos componentes do leite como a lactose, a gordura e a proteína verdadeira (HALASA et al., 2009).

Por outro lado, a colonização do epitélio secretor pelos patógenos causadores de mastite pode reduzir o número de células produtoras de leite, pois quanto maior o grau de resposta à infecção, maior será alteração dos componentes do leite e maior será o número de células somáticas, o que influencia diretamente na qualidade dos produtos fabricados a partir deste leite, por exemplo, menor vida de prateleira dos produtos (LOSINGER et al., 2005). Sendo assim, a CCS está diretamente relacionada com o rendimento de derivados lácteos (LOPES et al., 2011). Além dos fatores associados aos custos diretos causados pela mastite, existem outros fatores não relacionados à mastite, mas que podem levar a variações do custo final do leite ao longo do tempo, como o preço de mercado do leite e os custos associados à alimentação (HOGVEEN et al., 2011).

No Brasil, a produção de leite, como outros segmentos, é uma atividade cada vez mais competitiva. Estudos realizados em propriedades brasileiras, para estimar os custos da mastite subclínica, apresentaram resultados de perda de 4,6 bilhões de litros de leite, o que representaria aproximadamente 2,3 bilhões de reais levando-se em conta os dados de produção do ano de 2009 (COLDEBELLA et al., 2004; SOUZA et al., 2010). Na Holanda, estima-se que as perdas econômicas devido à mastite clínica e subclínica variam entre €17 e €198/vaca/ano (HOGVEEN et al., 2011). Em média, o custo total de um caso de mastite clínica causada por *Streptococcus* spp., baseado no tratamento com antimicrobiano intramamário, durante 3 dias, foi de 196 dólares, enquanto para o micro-organismo *S. aureus* foi de 255 dólares (LOSINGER, 2005).

2.2 DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA

A técnica adotada nas coletas de leite, tanto de tanque quanto de amostras individuais das vacas é de extrema importância para não haver contaminação e ter resultados confiáveis. A contaminação do leite pode ocorrer por condições inadequadas de obtenção,

armazenamento, coleta e transporte, bem como pela sua riqueza nutricional, que o torna um meio ideal para a multiplicação microbiana (EDMONDSON, 2005).

2.2.1 Coleta de amostras individuais de leite de vaca

Para a coleta de amostras individuais de leite de vaca em tubo estéril, o procedimento padrão inclui a limpeza e desinfecção das extremidades e o orifício do canal do teto por meio de uma gaze, ou algodão, umedecido com solução de álcool iodado (70%) e descarte dos três primeiros jatos. As amostras devem ser acondicionadas em uma caixa isotérmica, sob refrigeração a 4°C, para processamento no mesmo dia de coleta, ou seguidas de congelamento a -20°C para análise em momento posterior (NMC, 2004).

As amostragens por quarto mamário e leite de tanque são as mais comumente utilizadas. Apesar da amostragem por quarto mamário apresentar custos elevados, o conhecimento do agente etiológico das infecções pode justificar o investimento, o que diferentemente das amostras de tanque que fornecem informações limitadas a respeito das infecções do rebanho. Um exemplo das limitações da cultura de leite de tanque é a baixa relação existente para agentes ambientais como coliformes ou *Pseudomonas* spp. em amostras de tanque como causa de mastite. Assim, a presença destes agentes na amostra de leite de tanque não significa necessariamente tenham origem como causadores da mastite (BRITTEN, 2012). Embora seja metodologia padrão o diagnóstico microbiológico de identificação dos micro-organismos causadores de mastite, a CCS é um dos métodos mais utilizados para a verificação de presença de mastite no rebanho, por ser de diagnóstico rápido e mais barato (JAYARAO, WOLFGANG, 2003).

2.2.2 Coleta de amostras de leite de tanque

Para a coleta de amostras de tanque, o leite deve ser agitado previamente por 5 a 10 minutos antes da coleta sob refrigeração a 4°C. As amostras de leite devem ser coletadas da parte superior do tanque usando uma concha coletora sanitizada. Aproximadamente 60 ml de leite devem ser coletados, armazenados em frasco estéril, identificado e acondicionados sob

4°C até a análise. As análises devem ser realizadas dentro de 36 horas (JAYARAO; WOLFGANG, 2003; JAYARAO et al., 2004).

A análise de leite de tanque é amplamente aceita como ferramenta para a avaliação da qualidade do leite e monitoramento da saúde do úbere do rebanho (RYSANEK et al., 2007). A contagem bacteriana do leite do tanque, quando procedida mais de uma vez num período de tempo, pode fornecer uma base de informações significativas em relação as práticas de higiene de manejo de ordenha e de limpeza de equipamentos de ordenha. Além disso, a análise de leite de tanque é menos onerosa, menos trabalhosa e mais rápida do que a análise de leite de animais individuais (JAYARAO; WOLFGANG et al., 2003; JAYARAO et al., 2004).

A cultura de leite de tanque apresenta vantagens e desvantagens para o monitoramento de patógenos ambientais (JAYARAO; WOLFGANG, 2003; JAYARAO et al., 2004). O reservatório de patógenos ambientais não é o tecido mamário, mas sim o solo, cama e fezes das vacas que contaminam a pele do teto antes da ordenha. Portanto, a correlação entre a contagem de bactérias ambientais e a prevalência de IIM ambiental é baixa (GODDEN et al., 2002).

Por outro lado, os resultados de cultura de leite de tanque têm sido criticados pela sua baixa sensibilidade em detectar patógenos contagiosos da mastite, como *S. agalactiae* e/ou *S. aureus* dentro do rebanho. O aumento da sensibilidade de detecção de *S. agalactiae* e/ou *S. aureus* pode aumentar com a análise da cultura microbiológica repetidas vezes durante um período de tempo, quando semeando maiores volumes de leite, ou utilizando meios de cultura enriquecidos (JAYARAO et al., 2004; JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Apesar da baixa sensibilidade de detecção, a cultura de leite de tanque possui alta especificidade para patógenos contagiosos, sendo uma ferramenta útil no monitoramento destes micro-organismos, uma vez que a presença de *S. agalactiae*, *S. aureus* ou *Mycoplasma* por meio de cultura microbiológica pode ser considerado um indicador confiável de IIM (GODDEN et al., 2002).

2.2.3 Contagem de células somáticas

A CCS do leite é utilizada como indicador de saúde da glândula mamária, pois caracteriza a resposta imunológica do tecido mamário. Mais de 95% das células somáticas são

leucócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Apesar da elevação da CCS ser um indicador aceitável de presença de infecção bacteriana, baixa CCS pode estar associada a maior susceptibilidade de mastite clínica. Isto sugere que as células somáticas funcionam tanto como parâmetro de resposta do epitélio secretor anteriormente à invasão bacteriana, quanto parâmetro de sanidade da glândula mamária uma vez que a infecção está estabelecida (BRADLEY; GREEN, 2005).

Em vacas saudáveis, os macrófagos são as células de defesa predominantes encontradas no leite e no tecido mamário. Os macrófagos fazem parte do sistema de defesa não específico e participam do processo de apresentação de antígeno (BRADLEY; GREEN, 2005). Entretanto, mastites infecciosas envolvendo os patógenos principais são mais propensas em resultar em CCS maiores que 200.000 células/mL, enquanto que os patógenos secundários, geralmente apresentam CCS entre 50.000 e 150.000 células/mL. No entanto, existe dificuldade em distinguir IIM causadas por patógenos principais dos casos ocasionados por patógenos secundários levando-se em conta apenas a CCS de uma amostra (BRADLEY, 2002). Especificamente, *S. agalactiae* tem a capacidade de se replicar a cada 30-40 minutos, o que demanda um rápido recrutamento de neutrófilos sanguíneos nas primeiras 12-18 horas após infecção (BURTON; ERSKINE, 2003).

O nível da resposta celular e os tipos de células imunológicas dependem do patógeno presente na glândula mamária e da sua patogenicidade (LE ROUX et al., 2003). No pós-parto ocorre elevação da CCS independentemente da existência de infecção em vacas (DOHOO; MEEK, 1982). Também observa-se maior CCS em vacas mais velhas, pelo aumento da prevalência de IIM nesses animais (SHARMA et al., 2011). Observa-se reduzida CCS no período do inverno quando comparada a CCS durante o verão, pois ocorre maior multiplicação bacteriana no ambiente neste período nas fezes e cama (KHATE; YADAV, 2010). A CCS é menor na primeira ordenha pelo efeito de diluição, já a segunda ordenha apresenta maior CCS (FORSBÄCK et al. 2010), desta forma para se amostrar a CCS adequadamente deve-se coletar uma alíquota de todo o leite produzido pelo quarto mamário, Gonzalo et al. (2003) descreveram que a melhor forma de conservação da células somáticas se faz com o uso de bronopol (50mg/ 100mL).

A contagem de células somáticas do leite do tanque esta correlacionada linearmente ao percentual de quartos infectados por patógenos primários no rebanho (EBERHART et al., 1982; RYSANEK et al., 2007). A CCS do leite de tanque é composta pela quantidade de células somáticas de cada vaca, sendo uma forma de estimar a prevalência de IIM dentro do rebanho. De forma geral considera-se que para cada 100.000 células/mL aumentadas no

tanque, há aumento de 10% na prevalência de IIM no rebanho (BRADLEY; GREEN, 2005). Além disso, a CCS do tanque esta correlacionada em 87% a estimativa da CCS de quartos mamários, o que permite avaliar a contribuição do grau de infecção de cada caso de mastite isolado na contagem de células do tanque, isto é apenas uma vaca pode aumentar a CCS do leite de tanque consideravelmente (KELTON; GODKIN, 2000; RYSANEK et al., 2007).

De maneira similar, a estratégia de amostrar leite de tanques para determinação da CCS ou cultura microbiológica apresenta vantagens e desvantagens. Uma desvantagem da coleta de leite de tanque pode ser atribuída ao fato da CCS ser mensurada a partir de apenas uma amostra, não sendo possível associação do valor médio de CCS representativo do rebanho a lotes individuais em lactação. Enquanto que a presença de cultura microbiológica de patógenos contagiosos, como *S. agalactiae*, *S. aureus*, ou *M. bovis* indica que pelo menos uma vaca no rebanho está infectada, e é fonte de contaminação em níveis detectáveis. A contagem bacteriana não fornece nenhuma estimativa de prevalência ou presença de quartos infectados no rebanho, ao contrário da realização de cultura microbiológica por quartos individualmente, o qual é o procedimento mais indicado para estimativas de prevalência (GODDEN et al., 2002).

2.2.4 Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total (CBT) é um dos indicadores da qualidade do leite (CASSOLI et al., 2010). O número de bactérias contidas no leite é expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro de leite (UFC/mL). A CBT indica as condições gerais de higiene e refrigeração do leite, desde sua obtenção até o envio para a indústria. Leite com alta CBT apresenta impacto negativo em toda a cadeia de produção de leite: produtor, indústria e consumidor (JAYARAO et al., 2004).

Alta contagem bacteriana pode acarretar vários prejuízos, tais como: desvalorização do leite pelas empresas que realizam o pagamento por qualidade; alterações no sabor e odor do leite e seus derivados; alterações no tempo de validade do leite *in natura* e dos produtos lácteos e, até mesmo, risco de toxi-infecções intestinais e sistêmicas no consumidor, tendo, portanto, um importante impacto na segurança dos alimentos (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). De forma geral, as principais fontes de contaminação direta de bactérias para o leite cru são: quartos mamários infectados (mastite), úbere e pele dos tetos e utensílios e/ou

equipamentos que entrem em contato com o leite (ZADOKS, et al., 2005; CASSOLI et al., 2010).

2.2.5 Técnicas de diagnóstico microbiológico da mastite

2.2.5.1 Cultura microbiológica

A identificação de patógenos causadores de mastite é importante para o controle da doença e estudos epidemiológicos (FORSMAN et al., 1997). As metodologias de cultura microbiológica convencionais são consideradas referências para a identificação de patógenos causadores de mastite. O isolamento e identificação de bactérias realizados laboratorialmente baseiam-se na análise de características fenotípicas, realização de testes bioquímicos, sorotipagem e perfis enzimáticos e é importante que a espécie bacteriana seja identificada para o direcionamento do tratamento. Apesar da cultura microbiológica ser o método mais utilizado para o diagnóstico da mastite bovina, é uma análise que requer pelo menos 24-48h, é trabalhosa, exige conhecimento técnico e demanda tempo para a identificação final do agente (GILLESPIE; OLIVER, 2005; KOSKINEN et al., 2010)

Para a mastite clínica, o diagnóstico rápido seria preferível, por auxiliar na decisão sobre o tratamento o quanto antes. Maior tempo para a obtenção do diagnóstico da cultura microbiológica pode levar a um período maior da duração total do tratamento ou a utilização desnecessária de antimicrobianos de amplo espectro. Além disso, mesmo seguindo os procedimentos laboratoriais padronizados, pode-se observar discrepância dos resultados interlaboratoriais (KOSKINEN et al., 2010).

As vantagens associadas aos métodos convencionais de cultura microbiológica é que são úteis na identificação do patógeno causador da mastite e fornecem informações para a seleção da terapia antimicrobiana adequada. No entanto, existem várias desvantagens associadas aos métodos microbiológicos convencionais (PHUEKTES et al., 2001). Resultados de cultura sem crescimento podem ser decorrentes de antibióticos residuais após terapia ou de baixo número de patógenos na amostra. A presença de leucócitos no leite devido a casos de mastite clínica também pode resultar em ausência de crescimento microbiológico (PHUEKTES et al., 2001).

A identificação dos patógenos causadores de mastite em amostras de leite baseada na cultura microbiológica convencional pode gerar resultados falso-negativos pela baixa especificidade (KOSKINEN, et al. 2009).

Streptococcus agalactiae possui características bioquímicas que permitem sua identificação com segurança, pois é classificado no grupo B de Lancefield, produz hemólise do tipo beta, apresenta fator CAMP e hidrolisa o hipurato de sódio; não hidrolisa a esculina, e não cresce em presença de bile-esculina (SANTOS et al., 2006).

2.2.5.2 Metodologias de semeadura em placa

A seleção do meio de cultura e condições atmosféricas são essenciais para o isolamento do patógeno na amostra. Rotineiramente, para o isolamento de muitos patógenos utiliza-se ágar sangue seguido de incubação por 24-48 horas a 37°C. Existem vários tipos de meios de cultura indicados quando se procura pesquisar algum patógeno específico, são os meios de cultura seletivos (SMITH et al., 2000; JAYARAO, WOLFGANG, 2003).

De forma geral, a técnica para se obter colônias isoladas no meio agar é feita utilizando alça de inoculação estéril, inoculando-a na amostra e espalhando sobre uma pequena área na parte superior da placa. O inóculo então espalhado de maneira sequencial sobre mais três áreas contínuas da placa. Deve-se flambar a alça antes de espalhar o inóculo para a área seguinte da placa. Esta técnica de semeadura permite o crescimento de colônias isoladas, o que é essencial para a identificação fenotípica dos patógenos. A identificação definitiva do micro-organismo é feita então quando se repica esta colônia suspeita cultivando-a novamente para obtenção de colônias puras que possam ser utilizadas para a realização de outros testes bioquímicos. Na pesquisa de *Streptococcus agalactiae* pode-se utilizar o Edward sangue, que trata-se de um meio a seletivo para o isolamento e diferenciação de estreptococos (SMITH et al., 2000).

2.2.5.3 Técnica de biologia molecular por PCR em tempo real

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de buscar métodos mais rápidos de diagnósticos em substituição da microbiologia convencional, como hibridação de DNA, os imunoenaios enzimáticos e qPCR (FUKUSHIMA et al., 2007).

Os métodos moleculares possuem características e potencial velocidade de diagnóstico que não é possível se obter com os métodos fenotípicos e de cultura microbiológica, o que têm contribuído com o estudo sobre a epidemiologia da mastite, deterioração de derivados de leite e qualidade de leite de tanque. Observa-se que, raramente, a presença do *S. agalactiae* no leite do tanque pode ser associada com contaminação de fontes não provenientes de glândulas mamárias de vacas infectadas (ZADOKS, et al., 2005).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para detectar patógenos causadores de mastite, além de apresentar vantagens como: rápidos resultados, alta sensibilidade e potencial para fazer maior quantidade de análises por tempo (JIAN et al., 2011). A PCR, por ser um método de detecção e identificação específica de patógenos não depende da viabilidade de micro-organismos na amostra, podendo ser realizada em amostras com a presença de conservantes, o que não é possível por métodos convencionais de cultura microbiológica (MEYER et al., 1991). A PCR apresentou maior sensibilidade do que a cultura microbiológica para a detecção de bactérias em amostras de leite de vacas com mastite clínica, subclínica, e em vacas saudáveis (KATHOLM et al., 2012).

A PCR é uma técnica rápida que permite a amplificação de regiões do genoma, a partir de mínimas quantidades de DNA, mesmo quando este se encontra em mínima quantidade (BAREA et al., 2004). A utilização desta metodologia molecular para a detecção de micro-organismos causadores da mastite bovina apresentam sensibilidade e especificidade diagnósticas comparáveis às metodologias qualitativas de diagnóstico microbiológico convencional (TAPONEN et al., 2009).

A metodologia de qPCR não só serve como meio diagnóstico de detecção do patógeno, mas possui potencial para a quantificação simultânea do alvo que está sendo amplificado (KOSKINEN et al., 2009). A qPCR quantifica o número de cópias de ácidos nucleicos com precisão e maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação o que reflete a diferença na quantidade inicial de moléculas de DNA (WATZINGER et al., 2006). O método de qPCR permite a identificação de bactérias em média de 2 horas (GILLESPIE; OLIVER, 2005).

2.3 MASTITE BOVINA CONTAGIOSA POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Streptococcus agalactiae, é um coco Gram-positivo que cresce em forma de corrente no leite e em meios de cultura líquidos, é um dos patógenos mais importantes causadores de mastite altamente contagioso que parasita obrigatoriamente o interior da glândula mamária causando infecção persistente com baixa taxa de cura espontânea (KEEFE et al., 1997; MAKOVEC; RUEGG, 2003). É eliminado em grande quantidade a partir de quartos infectados e pode ser facilmente isolado em amostras de leite de tanque (KEEFE, 1997).

A forma mais frequente que o *S. agalactiae* infecta um rebanho livre deste patógeno é pela aquisição de vacas adultas infectadas sem prévio exame microbiológico do leite. Rebanhos com vacas com mastite causada por *S. agalactiae* possivelmente possuem práticas de manejo de controle e prevenção de mastite deficientes (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

Este micro-organismo tem a habilidade de entrar pelo canal do teto e causar infecções subclínicas, levando à diminuição na produção de leite (BRITO et al., 2000) e as vacas infectadas são fonte de infecção para o rebanho (VILLANUEVA et al., 1991). *S. agalactiae* tem a capacidade de se aderir ao epitélio secretor da glândula mamária, que possui condições ideais para seu desenvolvimento (MINST et al., 2012). Além de que diferentes fatores de virulência das várias cepas estão relacionados à habilidade do patógeno aderir-se ao epitélio mamário (KEEFE, 1997; OLIVER et al., 2004).

Em muitos países a mastite por *S. agalactiae* ainda é comum, embora países desenvolvidos praticamente eliminaram este patógeno (BARKEMA et., al., 2009). Este micro-organismo causa principalmente mastite subclínica que pode se tornar crônica com o passar do tempo (NMC, 1996). Esta alteração na qualidade do leite e redução da produção representa o maior problema econômico causado pela mastite na indústria leiteira (HALASA et al., 2009).

S. agalactiae é uma das espécies de estreptococos mais comumente identificadas e tem sido detectada em 31 a 48% de amostras de leite de tanque (ZADOKS et al., 2004). Por ser um patógeno que habita obrigatoriamente o interior do úbere, a presença no leite do tanque demonstra que este agente foi disseminado a partir de quartos mamários infectados (BARTLETT et al., 1991). Quando existe no rebanho casos de IIM causada por *S. agalactiae* significa que existe alta prevalência dentro deste rebanho (KEEFE, 1997).

Streptococcus agalactiae foi a maior causa de casos de mastite na época em que não se utilizava tratamento antimicrobiano (OLIVER et al., 2004), o que levou ao desenvolvimento de mastites crônicas em muitos rebanhos. Os procedimentos para diagnóstico e tratamento de IIM causadas por *S. agalactiae* são bem estabelecidos. Uma vez que o *S. agalactiae* tem a habilidade de sobreviver por longo período dentro da glândula mamária e é sensível à terapia a base de penicilina, é possível a erradicação deste patógeno dentro de um rebanho fechado. É possível manter rebanhos fechados livres de *S. agalactiae* (KEEFE, 1997).

S. agalactiae é um problema para a indústria leiteira em alguns países e é um patógeno causador de mastite subclínica que pode ser tratado durante a lactação. É possível eliminá-lo de rebanhos utilizando blitz terapia juntamente com adoção de práticas de manejo de higienização e procedimentos de sanitização (OLIVER et al., 1990). Vacas que não respondem ao primeiro tratamento e não são identificadas ou abatidas podem atuar como reservatório da infecção. Em rebanhos onde há deficiência nas práticas de pré e pós dipping e outras práticas de higiene, o patógeno pode se disseminar rapidamente e infectar vacas sadias (OLIVER et al., 2004).

A quantidade de *S. agalactiae* disseminada no ambiente nos casos crônicos de mastite aumenta e diminui apresentando um padrão cíclico e embora quartos infectados cronicamente apresentarem grande número de bactérias em seu interior, existem momentos em que um número muito baixo de micro-organismo é disseminado pela glândula mamária, o que pode gerar um resultado negativo de cultura microbiológica (DINSMORE et al., 1991).

A cultura microbiológica e o tratamento apenas de animais positivos apresenta maior taxa de custo benefício do que tratamento realizado utilizando valores de CCS aumentada como critério ou blitz terapia de todas as vacas em lactação do rebanho (KEEFE, 1997).

A mastite subclínica causada pelo *S. agalactiae* produz impacto significativo na quantidade e qualidade do leite produzido. Programas de controle e erradicação em nível de rebanho tem se mostrado eficientes economicamente. Há a necessidade de se continuar as pesquisas de formas de diagnóstico mais sensíveis em nível de rebanho e em menor tempo. Maiores informações associadas a programas de educação aos produtores pode reduzir os níveis de prevalência de IMM por este patógeno. Programas de manejo de controle de mastite subclínica por *S. agalactiae*, em particular são efetivos em controlar a infecção no rebanho (KEEFE, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE

Foram utilizadas amostras compostas de leite de vacas com isolamento de *Streptococcus agalactiae* (n=31), coletadas a partir de fazendas leiteiras localizadas em Pirassununga - SP, para o desenvolvimento do presente estudo. As amostras de leite de tanque (n=150) foram fornecidas por dois laticínios da região de Pirassununga sendo que o critério de seleção foi que os resultados apresentassem a CCS maior que 600.000 células/mL. Todas as amostras de leite foram mantidas a -20°C, até o momento da análise.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE *S. AGALACTIAE* POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

3.2.1 Leite de vaca

As amostras de leite de vaca foram analisadas conforme metodologia recomendada pelo National Mastitis Council (HOGAN et al., 1999). Foram inoculados 10 µL da amostra de leite em placa de Petri com meio sólido ágar soja tripticase, enriquecido de 5% de sangue ovino desfibrinado. Em seguida, a placa foi invertida e incubada à 37°C. O padrão de crescimento bacteriano foi observado em intervalos de 24 horas durante o período de 3 dias. Após a leitura das placas, as bactérias foram presumivelmente identificadas conforme as características fenotípicas coloniais como: colônias pequenas, circulares, brilhantes, acinzentadas com presença ou ausência de beta hemólise ao seu redor (Figura 1). Em seguida foi realizada a prova da catalase, com a transferência de uma colônia suspeita para uma lâmina de vidro com adição de 50 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para a observação de formação de bolhas. Após a observação das características morfológicas e teste da catalase, as bactérias foram submetidas às provas bioquímicas: produção do fator CAMP, hidrólise da esculina e hidrólise do hipurato.

Figura 1 - Colônias típicas de *Streptococcus* spp.

Fonte: (CARVALHO, N. L, 2013)

3.2.2 Leite de tanque

As amostras de leite de tanque foram analisadas conforme metodologia recomendada pelo National Mastitis Council (HOGAN et al., 1999). Para cada amostra de leite, foram inoculados 10 µL em placa de Petri com meio sólido ágar Edwards sangue, enriquecido de 5% de sangue ovino desfibrinado. Em seguida, a placa foi invertida e incubada à 37°C. Este meio de cultura é seletivo ao crescimento da espécie de *Streptococcus agalactiae*, sendo necessário tempo de crescimento de 24 horas em estufa a 37°C. Após leitura das placas, as amostras que apresentaram crescimento foram submetidas à diferenciação fenotípica. Sendo assim, as colônias que apresentavam coloração azulada e ausência de fermentação (Figura 2) foram submetidas a testes bioquímicos, produção do fator CAMP, hidrólise da esculina e hidrólise do hipurato para confirmação da espécie.

Figura 2 - Colônias típicas de *S. agalactiae* em meio seletivo Edwards sangue.

Fonte: (CARVALHO, N. L, 2013)

Os isolados bacterianos foram identificados como *S. agalactiae* quando foram identificados como cocos Gram positivos, com reação negativa à catalase, positiva a produção do fator CAMP, negativa a hidrólise da esculina e positiva a hidrólise do hipurato (BRITO et al., 2000).

3.3 CONTAGEM DE *S. AGALACTIAE* POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

3.3.1 Técnica da diluição seriada para quantificação de *S. agalactiae*

As amostras de leite com isolamento positivo de *S. agalactiae* foram diluídas e semeadas em triplicata em meio de cultura seletivo Edward sangue para contagem das unidades formadoras de colônia (Figura 3).

A diluição procedeu da seguinte forma: a) Após homogeneização da amostra de leite, 1 mL de cada amostra de leite homogeneizada foi diluído em 9 mL de solução salina 0,9% estéril em concentração final de 1:10, o que foi denominado de tubo de ensaio 1, 10^{-1} ; b) Em etapa seguinte, 1 mL da solução do tubo 1 foi adicionado a um novo tubo de ensaio (tubo 2,

10^{-2}) contendo 9 mL de solução salina; c) 1 mL da solução do tubo 2 foi adicionado a um novo tubo de ensaio (tubo 3, 10^{-3}) contendo 9 mL de solução salina, totalizando 3 diluições seriadas (HOGAN et al., 2005).

Figura 3 - Esquema de diluição seriada de leite em solução salina 0,9%.

Fonte: (CARVALHO, N. L, 2013)

Para semeadura das alíquotas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), foi adicionado 1 mL de cada diluição em placa com meio Edwards sangue, com auxílio de pipeta e distribuídas na superfície do meio com auxílio de alça de drigalski. Após crescimento, as colônias foram visualmente contadas em UFC/mL. O valor da leitura em unidades de colônias de cada placa foi multiplicado pela respectiva potência da diluição que amostra de leite foi submetida. Para cada amostra de leite foram realizadas três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), e para cada diluição, foi realizada uma semeadura em placa, totalizando três contagens de UFC, a qual por meio média aritmética concluiu-se um valor final de contagem de *Streptococcus agalactiae* por

amostra de leite. A média de contagem foi transformada em função logarítmica, sendo denominada com contagem medida ou contagem de referência.

3.3.2 Técnica de quantificação de DNA bacteriano pela qPCR

As metodologias biomoleculares adotadas no presente estudo foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Pesquisa em Bovinos - Departamento de Nutrição e Produção Animal, da FMVZ-USP (Pirassununga, SP).

Para a quantificação de DNA bacteriano das amostras de leite, oriundas de vacas e de tanque, por meio da tecnologia de qPCR, foi necessária elaboração de uma equação por meio de regressão linear entre as variáveis UFC/mL (y), descrita anteriormente pela metodologia de semeadura de superfície, e *cycle threshold* - Ct (x) ponto que inicia a detecção de fluorescência. A equação foi denominada como curva de quantificação.

3.3.2.1 Construção da curva de quantificação

A cepa liofilizada de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) foi ressuspensa em 100 µl de água destilada estéril. A solução de ATCC foi inoculada em 6 mL de meio caldo de infusão de cérebro e coração estéril (BHI, Merck, Darmstadt, Alemanha), e incubada a 37°C por 15 horas. Após o tempo de incubação, foi observada a presença de turvação, o que caracterizava a multiplicação da cepa em análise. Em seguida, a cepa de *S. agalactiae* foi inoculada em ágar sangue e confirmada segundo a metodologia de cultura microbiológica descrita anteriormente (4.2.1) como forma de controle interno do presente estudo.

Para o preparo dos padrões para quantificação do *S. agalactiae*, 1 ml do caldo BHI com a ATCC foi inoculado em 9 mL de leite em pó desnatado estéril reconstituído na proporção de 1:9. Este procedimento serviu de base para a técnica da diluição seriada de quantificação de *S. agalactiae*, semelhante ao item 4.3.1, porém com a principal diferença de ter utilizado o leite estéril como diluente e ter sido realizado 10 diluições. Para cada uma das diluições (10^{-1} até 10^{-10}) foi realizado, em triplicata, semeadura (procedimento descrito nos

itens 4.2.2 e 4.3.1) em placa de Edwards sangue (Figura 4). A determinação da contagem de *S. agalactiae* em amostras de leite contaminado artificialmente foi realizada por contagem visual e expressas em UFC/mL (HOGAN et al., 2005). Os valores de UFC/mL das triplicatas foram submetidos a cálculos de média aritmética, sendo transformados em função logarítmica denominados em UFC/mL medida ou referência. Estes dados de log da contagem de *S. agalactiae* foram relacionados por meio de regressão linear aos resultados de Ct (*cycle threshold*) obtidos pela técnica de qPCR.

Figura 4 - Esquema de diluição seriada de cepa ATCC *S. agalactiae* em leite desnatado em pó reconstituído estéril.

Fonte: (CARVALHO, N. L, 2013)

A. Extração do DNA bacteriano

As amostras de leite foram processadas, em duplicata, utilizando-se o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Minneapolis, MN EUA), conforme orientação do fabricante, o protocolo foi adaptado da seguinte forma: 200 µl de amostra leite positivo para *S. agalactiae* foi adicionado ao microtubo de 1,5 mL, em seguida foi adicionado de 200 µl de tampão AD

(fornecido pelo fabricante) e 200 µl de tampão AL (fornecido pelo fabricante), feita a homogeneização em vórtex por 1 minuto, seguida de incubação à 95°C por 10 minutos.

Foi adicionado 20 µl de proteinase K (fornecida pelo fabricante) e incubado à 70°C por 10 minutos. Adicionou-se então 200 µl de etanol absoluto ao tubo, e o volume total, após agitado em vórtex, foi totalmente transferido para o dispositivo de coluna de sílica (fornecida pelo fabricante) para centrifugação a $6.000 \times g$ por um minuto. Em seguida, 500 µL de tampão de lavagem AW1 (fornecido pelo fabricante) foram adicionados, e o volume novamente centrifugado a $6.000 \times g$ por um minuto.

O procedimento de segunda lavagem foi realizado na sequência, com a adição de 500 µL do tampão de lavagem AW2 (fornecido pelo fabricante), seguido da centrifugação a $20.000 \times g$ durante três minutos. O DNA extraído retido na coluna foi eluído para um microtubo de 1,5 mL pela adição de 200 µL tampão de eluição AE (fornecido pelo fabricante), incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, e centrifugado a $6.000 \times g$ durante um minuto, seguida de uma segunda centrifugação sob as mesmas condições. O DNA eluído foi mantido sob temperatura de -20°C até o momento da realização da PCR em tempo real.

B. Detecção de DNA na amostra

Foi realizada quantificação de DNA por meio do equipamento NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE) para 4 amostras de leite de tanque após extração de DNA.

Para confirmar a existência de DNA após o procedimento de extração foi utilizado a metodologia de qPCR para detecção da Ct por meio do uso de um par de *primers* (senso GCAATACACTACACATCCGACACAA e antisenso GCGTGTATGTATCGGATGATTGAG), PrimerExpress® (Applied Biosystems, Foster, EUA). Estes *primers* amplificaram a região genômica codificante do citocromo mitocondrial B (assim denominado BMCB) (GeneBank accession number V00654), que portanto, deve estar presente em todas as células.

C. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação da PCR para a detecção de *S. agalactiae* foram aqueles descritos por Meiri-Bendek et al.(2002): a) Senso: 5'-

TTTGGTGTTTACACTAGACTG-3'; e, b)Antisenso: 5'-TGTGTTAATTACTCTTATGCG-3'.

Este par de oligonucleotídeos iniciadores é comum a todos os isolados de *S. agalactiae* depositados no GenBank (Genbank accession numbers: AB023574, AF135453, AF088900, AF015928, AB002517, AF076028, AB023576, AF003932, AF009494, AF104675, J243965), e se mostrou capaz de diferenciar *S. agalactiae* de outras espécies de *Streptococcus*.

D. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação de amplificação *simplex* de cada um dos alvos foi realizada, em duplicata, em equipamento StepOne® (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Cada reação de amplificação foi composta por 10 µL de SYBR Green PCR - Master Mix® (Applied Biosystems, Foster, EUA), 0,5 µL dos *primers* senso e antisenso em concentração a 20 pmol, 8,5 µL de água nucleasse free e 0,5 µL de ácido nucleico (DNA), totalizando uma reação de 20 µL. O programa do termociclador teve como ciclo inicial 95°C por 10 minutos, 5 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. As amplificações foram feitas em placas de reação de 48 poços MicroAmp® (Applied Biosystems, Foster, EUA). Em cada ciclo, a acumulação dos produtos de PCR foi detectada monitorando-se o aumento na fluorescência da ligação de fluoróforo aos fragmentos. Ao fim da amplificação, uma curva de dissociação foi construída na amplitude de 60°C a 95°C, para o alvo genômico com o *primer* de *S. agalactiae*, que teve temperatura média de dissociação após a otimização da reação de 78,4°C.

E. Correlação entre o valor de Ct e a concentração de DNA

Após o crescimento da cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 em caldo BHI, uma alíquota de 1 mL foi submetida a extração de DNA, e diluição seriada com água nucleasse free (10^{-1} até 10^{-10}), para processamento por meio da técnica de qPCR. Com a técnica de biologia molecular foi possível detectar os valores de Ct de cada diluição de DNA. Estes testes foram executados na tentativa de relacionar os valores de Ct das diluições realizadas com o DNA extraído da cepa padrão, com a concentração de ácido nucléico, que foi considerada a potência da diluição de DNA extraído.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a construção da curva padrão de quantificação de *S. agalactiae*, os dados de quantificação (Contagem de *S. agalactiae* e Ct) da cepa padrão ATCC 13813 foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 ($\log_{10}$) a fim de minimizar a heterogeneidade das variâncias para a análise estatística, e à função antilogarítmica para apresentação dos resultados. Os dados transformados foram denominados como Log contagem de *S. agalactiae* de referência provenientes da microbiologia por semeadura em superfície de placa, e Log da variável Ct oriundo da qPCR. A variável Ct é uma forma de se aferir o quanto de DNA existe na amostra de acordo com o número de ciclos da reação até a etapa de amplificação do material nucléico. Sendo assim, níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade alvo de DNA na amostra (isto é, quanto mais baixo o nível Ct maior a quantidade de DNA alvo presente na amostra). A equação padrão para quantificação de *S. agalactiae* direto do leite foi elaborada por meio da função matemática de regressão linear, entre as variáveis UFC/mL (y) e Ct (x), analisada por meio do programa computacional SAS versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

3.4.1 Correlações estatísticas

Correlações estatísticas foram realizadas por meio de estatística de regressão para determinar o coeficiente de correlação (r) entre os Ct das amostras de *Streptococcus agalactiae* da ATCC 13813, leite de vaca e leite tanque, com os dados de UFC/mL. Além disso, realizou-se regressão entre os valores de Ct das diluições de DNA e suas respectivas concentrações (potenciação das diluições).

3.4.2 Determinação da sensibilidade analítica e da repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR

Os parâmetros de avaliação da sensibilidade e da repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR foram determinados conforme estabelecido no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* da Organização Internacional de Epizootias (VALLAT; EDWARDS, 2008).

A sensibilidade analítica do método de qPCR foi avaliada à partir das alíquotas das dez diluições seriadas de *S. agalactiae* ATCC 13813, utilizadas para a construção da curva padrão de quantificação do micro-organismo. Portanto, para determinar a sensibilidade analítica de um teste diagnóstico, utiliza-se a diluição a tal ponto que o método não seja capaz de detectar o alvo em questão em mais de 5% das repetições, dentro de um solvente que tenha as mesmas propriedades da matriz do analito (VALLAT; EDWARDS, 2008).

A repetibilidade foi processada, em dois dias diferentes, por meio da análise da variabilidade intra e interensaios de 6 amostras de leite de tanque, em duplicata, submetidas à todo protocolo proposto. Em seguida, foi calculado o coeficiente de variação intra e interensaios como demonstrados na figura 5.

A maior repetibilidade dos testes diagnósticos baseados no método de PCR consiste na minimização da variabilidade de resultados observados entre replicatas independentemente analisadas (após otimizados e padronizados os processos de extração e amplificação). Dessa forma, para avaliação da consistência intra e interensaio de toda metodologia adotada para detecção e quantificação de *S. agalactiae* no presente experimento, considerou-se aceitável uma variação (CV – coeficiente de variação) de até 5% (BUSTIN, 2004) entre os valores de Ct obtidos.

Figura 5 - Esquema de simplificado do cálculo do coeficiente de variação (CV) intra-ensaio e interensaio.

Fonte: (CARVALHO, N. L, 2013)

3.4.3 Análise da equivalência entre os métodos de quantificação

Para avaliar a equivalência entre o método de qPCR para a quantificação de *S. agalactiae* em amostras de leite, e os métodos de referência, utilizou-se o teste não-paramétrico das diferenças de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 2010). Assim, a hipótese nula, testada pela estatística t , foi a de equivalência entre os métodos, e portanto, a de não diferença significativa que, do ponto de vista estatístico, significou que o *Bias* ou a diferença média observada entre os dados obtidos por ambas metodologias (referência e qPCR), foi igual à zero. Contrariamente, um valor P significativo implicou na aceitação da hipótese alternativa (H_a : métodos não são equivalentes), e o *Bias* observado foi diferente de zero. Os limites de concordância aceitáveis entre os métodos de referência e de qPCR foram definidos tendo como os valores limítrofes do intervalo de confiança de 95% das diferenças entre as duas metodologias numa distribuição t , com $n - 1$ graus de liberdade, ou seja, $t (IC95\%) \pm$ erro padrão. A análise de Bland-Altman foi realizada por meio do pacote de análise estatística Analyse-it[®] (Analyse-it Software Ltd., Leeds, West Yorkshire, Reino Unido) para Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation Ltd., Redmons, Washington, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS DE LEITE E DE TANQUE

Das 31 amostras compostas de leite de vaca, 26 amostras (83,9%) apresentaram crescimento de *Streptococcus agalactiae* pela cultura microbiológica e 5 amostras foram descartadas por apresentarem crescimento de outras espécies de *Streptococcus*. Das 150 amostras de leite de tanque, 50 amostras (33,4%) apresentaram isolamento positivo de *Streptococcus agalactiae* em placa Edward sangue, que é um meio seletivo para *Streptococcus* spp., entretanto, dentre estas, 42 amostras (84%) apresentaram colônias típicas de *Streptococcus agalactiae* no meio Edwards sangue. Das 42 amostras com isolamento positivo de *S. agalactiae*, 4 amostras de leite de tanque foram descartadas por problemas de armazenamento. Diante disto, foram utilizadas 38 amostras de leite de tanque positivas para *S. agalactiae*.

4.2 CURVA PADRÃO DE CONTAGEM DE *S. AGALACTIAE* (ATCC 13813)

Das amostras de leite experimental contaminadas com *S. agalactiae* ATCC 13813, foram selecionadas diluições entre 10^{-4} e 10^{-7} que apresentaram número viável de colônias para a contagem de *S. agalactiae*. As placas em que foram semeadas alíquotas de diluições 10^{-1} a 10^{-3} foram descartadas por apresentarem excessivo crescimento bacteriano, sendo denominadas incontáveis. Por outro lado, as placas em que foram semeadas alíquotas de diluições 10^{-8} a 10^{-10} foram descartadas por não apresentarem crescimento bacteriano. A contagem de *S. agalactiae* foi transformada por função logarítmica Tabela 1.

Tabela 1 - Contagem de *S. agalactiae* por cultura microbiológica em amostras individuais de leite de vacas (n=26) e Ct pela qPCR.

Amostra	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (Log UFC/ml)	Média Ct ^a	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (Log UFC/ml) ^b Estimado
1	860	2,93	26,37	4,97
2	95	1,97	26,37	4,97
3	125	2,09	25,97	5,12
4	1840	3,26	19,70	7,50
5	1960	3,29	22,76	6,34
6	8960	3,95	21,23	6,92
7	703	2,84	22,40	6,48
8	466	2,64	26,80	4,81
9	70	1,84	30,48	3,42
10	7100	3,85	21,35	6,87
11	140	2,14	27,16	4,67
12	620	2,79	20,00	7,38
13	75200	4,87	21,63	6,77
14	446	2,64	26,80	4,81
15	370	2,56	22,21	6,55
16	600	2,77	25,25	5,40
17	3100	3,49	30,44	3,43
18	1040	3,01	25,13	5,44
19	55	1,74	- ^c	-
20	280	2,44	25,90	5,15
21	255	2,40	27,78	4,44
22	70	1,84	30,48	3,42
23	85	1,92	30,85	3,28
24	840	2,92	22,56	6,41
25	65	1,81	16,59	8,57
26	6813	3,83	27,97	4,37
	4313	2,76	24,68	5,61

^aMédia de Ct (*cycle threshold*), ponto que indica o momento a partir do qual a reação de qPCR é otimizada e o produto amplificado (DNA) é quantificado.

^bContagem de *S. agalactiae* (UFC/ml): estimado pela equação $\log_{10}\text{UFC} = -0,3783x + 14,954 \log_{10}\text{Ct}$.

^cNão houve amplificação de DNA na amostra.

4.2.1 Amostras individuais de leite e de tanque

Cada amostra de leite de vaca e de tanque, após isolamento positivo de *S. agalactiae*, foi diluída (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e submetida a incubação em placa de Edwards sangue. Os resultados de contagem de *S. agalactiae* foram transformados por função logarítmica (Tabela 1 e 2).

Tabela 2 - Contagem de *S. agalactiae* por cultura microbiológica em leite de tanque (n=38) e Ct pela qPCR.

Amostra	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (Log UFC/ml) ^a	Média Ct ^b	Contagem de <i>S. agalactiae</i> (Log UFC/ml) ^c Estimado
1	1200	3,07	30,67	3,35
2	33000	4,51	25,93	5,14
3	3200	3,50	28,41	4,20
4	50000	4,69	19,31	7,64
5	400	2,60	30,68	3,34
6	200000	5,30	23,65	6,00
7	300	2,47	29,12	3,93
8	100	2,00	29,02	3,97
9	300	2,47	24,18	5,80
10	120000	5,07	25,16	5,43
11	900	2,95	22,4	6,48
12	22000	4,34	26,86	4,79
13	5000	3,69	28,19	4,28
14	80000	4,90	25,77	5,20
15	2500	3,39	33,90	3,45
16	100	2,00	28,39	4,21
17	8500	3,92	32,07	2,82
18	1700	3,23	28,96	3,99
19	30000	4,47	26,45	4,94
20	100	2,00	33,95	2,11
21	600	2,77	30,42	3,44
22	120	2,07	32,20	2,77
23	5000	3,69	28,15	4,30
24	3000	3,47	29,62	3,74
25	5000	3,69	28,78	4,06
26	100	2,00	28,87	4,03
27	900	2,95	28,93	4,00
28	61000	4,78	27,65	4,49
29	100	2,00	31,03	3,21
30	1700	3,23	31,41	3,07
31	30000	4,47	29,64	3,77
32	9000	3,95	30,52	3,40
33	100	2,00	30,36	3,46
34	600	2,77	27,06	4,71
35	11000	4,04	25,92	5,14
36	35000	4,54	23,37	6,11
37	300	2,47	32,39	2,70
38	200	2,30	- ^d	-
Média	19026	3,36	28,26	4,26

^a Contagem de *S. agalactiae* (log UFC/ml)

^b Média de Ct (*cycle threshold*), ponto que indica o momento a partir do qual a reação de qPCR é otimizada e o produto amplificado (DNA) é quantificado.

^c Contagem de *S. agalactiae* (log UFC/ml): estimado pela equação: $\log_{10} \text{UFC} = -0,3783x + 14,954 \log_{10} \text{Ct}$.

^d Não houve amplificação de DNA na amostra.

4.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO PELA QPCR

4.3.1 Quantificação de DNA após processo de extração

O primer do gene codificador do citocromo B mitocondrial bovino (BMCB) foi utilizado para a confirmação da presença de DNA nas amostras extraídas, pela avaliação dos valores de Ct (Tabela 3). Estas amostras testes foram utilizadas como controle positivo dos procedimentos de extração. O protocolo de extração para as amostras 1, 2, 3 e 4, de leite de tanque positivas para *S. agalactiae*, foi efetivo. Além disso, observou-se relação inversa entre a contagem de *S. agalactiae* e a variável Ct, isto é, quanto maior o número de unidades formadoras de colônias por mililitros, maior a concentração de DNA, por apresentar menor Ct.

Tabela 3 – Amostras e testes utilizados para quantificação de DNA após processo de extração

Amostras	UFC/mL	Média Ct
Teste 1	-	19,46
Teste 1	-	19,46
Teste 2	-	19,39
Teste 2	-	19,39
Teste 3	-	14,80
Teste 3	-	14,80
Amostra 1	100	20,39
Amostra 1	100	20,39
Amostra 2	300	16,91
Amostra 2	300	16,91
Amostra 3	2000	14,40
Amostra 3	2000	14,40
Amostra 4	1700	19,93
Amostra 4	1700	19,93

4.3.2 Construção da curva padrão de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

A metodologia qPCR resultou valores de Ct para cada amostra. Os valores de Ct das amostras contaminadas artificialmente pela ATCC 13813 foram correlacionados a contagem de *S. agalactiae*, por meio de análise de regressão linear. O coeficiente de correlação ($r = 0,97$), entre as metodologias de microbiologia de semeadura em superfície e qPCR, respectivamente, foi significativo, o que permitiu a construção da equação para quantificação da contagem de *S. agalactiae* em leite de vacas e de tanque submetidos à qPCR. Foram considerados os resultados de contagem de 4 diluições seriadas de *S. agalactiae* ATCC 13813 das 10 diluições realizadas, para a construção da curva padrão (Tabela 1). Para construção da curva padrão, variaram de 3×10^2 à $3,2 \times 10^5$ UFC/mL. (Figura 6).

Figura 6 – Equação de regressão ($r = 0,971$; $P < 0,001$) entre os resultados de log contagem de *S. agalactiae* ATCC 13813, de quatro diluições (10^{-5} até 10^{-7}), e de Ct oriundos da técnica de qPCR (log Ct). ($\log_{10} \text{UFC} = 14,954 - (0,3783 * \log_{10} \text{Ct}$, $r = 0,97$)

Tabela 4 - Contagem média de *S. agalactiae* em leite contaminado artificialmente.

Amostras (diluições)	Média Ct ^a	Média UFC ^b	Estimativa UFC ^c	LogUFC ^d	Log ^e Estimativa
10 ⁻⁷	32,96	300	300	2,477121	2,477121
10 ⁻⁷	32,65	300	300	2,477121	2,477121
10 ⁻⁶	29,72	2900	3000	3,462398	3,477121
10 ⁻⁶	30,76	2900	3000	3,462398	3,477121
10 ⁻⁵	27,30	40000	30000	4,60206	4,477121
10 ⁻⁵	28,38	40000	30000	4,60206	4,477121
10 ⁻⁴	24,44	320000	300000	5,50515	5,477121
10 ⁻⁴	25,21	320000	300000	5,50515	5,477121

^aMédia de Ct (*cycle threshold*), ponto que indica o momento a partir do qual a reação de qPCR é otimizada e o produto amplificado (DNA) é quantificado.

^bMédia das contagens de *S. agalactiae* (UFC/ml) das três placas realizada para cada diluição (10⁻⁴ até 10⁻⁷) transformada em função logarítmica na base dez.

^cMédia das contagens de *S. agalactiae* (UFC/ml) das três placas realizada para cada diluição (10⁻⁴ até 10⁻⁷) em que realizou-se limite de intervalos de UFC/mL (estimativa).

^dMédia das contagens de *S. agalactiae* (UFC/ml) das três placas realizada para cada diluição (10⁻⁴ até 10⁻⁷) em que realizou-se limite de intervalos de UFC/mL (Log estimativa), transformada em função logarítmica na base dez, para construção da curva padrão.

^eMédia das contagens de *S. agalactiae* (UFC/ml) das três placas realizada para cada diluição (10⁻⁴ até 10⁻⁷) em que realizou-se limite de intervalos de UFC/mL (estimativa), transformada em função logarítmica na base dez, para construção da curva padrão.

4.3.3 Leite de amostras individuais de vaca e de tanque

Para as amostras individuais de leite de vaca, a técnica qPCR detectou (n = 25) 96,15% das amostras positivas para *S. agalactiae*. Para as amostras de leite de tanque, a qPCR detectou (n=37) 97,36% de amostras positivas para *S. agalactiae*. Apenas duas amostras não apresentaram amplificação de DNA, sendo uma do conjunto de dados leite de vaca e outra do conjunto de dados do leite de tanque. A metodologia qPCR resultou em valores de Ct para cada amostra de leite de vaca e de tanque avaliada. Estes valores de Ct foram correlacionados aos resultados de contagem de *S. agalactiae*, por regressão. Os resultados de 3 diluições seriadas de *S. agalactiae* de leite de tanque e de vaca para variável contagem de *S. agalactiae* (UFC/mL) foram considerados para correlação com o LogUFC(estimado), que é o logaritmo da média aritmética da variável Ct para cada amostra (Tabelas 2 e 3).

4.4 Correlação entre o valor de Ct e concentração de DNA

Com o uso de amostras testes (diluições 10^{-1} até 10^{-10} de DNA extraído da cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 em caldo BHI) foi possível estimar coeficiente de correlação ($r=0,79$) entre os valores de Ct das diluições de DNA e a concentração do ácido nucléico das amostras testes (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Correlação ($r = 0,792$; $P < 0,001$) entre os resultados de quantificação de DNA do *S. agalactiae* ATCC 13813 por qPCR (Ct), de dez diluições seriadas em água nuclease free, e concentração de DNA estimado pelo valor da potência da diluição. de Ct oriundos da técnica de qPCR (Ct). Os dados (Ct e concentração) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da concentração de DNA de *S. agalactiae*, a partir da amplificação do DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR é $\log_{10}\text{Conc DNA} = 19,391 - (9,8178 * \log_{10}\text{Ct})$.

Figura 8 - Representação gráfica da reação de qPCR para avaliação da variável Ct, em diferentes concentrações de DNA submetidos a dez diluições seriadas.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE CT E CONTAGEM DE *S. AGALACTIAE* (UFC/ML) DAS AMOSTRAS DE LEITE DE VACA

Para as amostras de leite de vacas, a correlação entre contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) e valores de Ct foi de 46% ($r=0,46$). Entretanto, o coeficiente r e a equação de correlação não foram estatisticamente significativas ($P=0,245$). (Figura 9).

Figura 9 - Correlação ($r = 0,462$; $P=0,245$) da contagem de *S. agalactiae* ($n= 25$) e Ct por meio da técnica qPCR. Os dados (UFC e Ct) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da UFC/mL de *S. agalactiae* a partir da amplificação de DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR é $\log_{10}UFC = 0,0045*(\log_{10}C)^2 - (0,3555* \log_{10}Ct) + 8,7831$.

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE CT E CONTAGEM DE *S. AGALACTIAE* EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE

Para as amostras de leite de tanques, a correlação entre contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) e valores de Ct foi de 29% ($r=0,29$). E o coeficiente r e a equação de correlação foram estatisticamente significativos ($P=0,009$). (Figura 10).

Figura 10 - Correlação ($r = 0,2951$; $P=0,0091$) da contagem de *S. agalactiae* ($n= 37$) e Ct por meio da técnica qPCR. Os dados (UFC e Ct) foram expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da contagem de *S. agalactiae* a partir da amplificação de DNA do mesmo micro-organismo pelo qPCR foi $\log_{10}UFC = 7,0393 - (0,1279*\log_{10}Ct)$.

4.7 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA E DA REPETIBILIDADE DO PROCEDIMENTO DIAGNÓSTICO POR QPCR PARA A DETECÇÃO DE *S. AGALACTIAE*

A sensibilidade analítica foi mensurada por meio das diluições seriadas, que foram realizadas com o objetivo da construção da curva padrão. Com a construção da curva padrão foi possível demonstrar que o procedimento de diagnóstico por qPCR para a detecção e quantificação de *S. agalactiae* está correlacionado 97% com a contagem de UFC/mL pela metodologia de referência.

Para a avaliação da repetibilidade do método qPCR, foi necessária mensuração dos coeficientes intra e interensaio. O CV intra-ensaio foi mensurado para o cálculo do CV interensaio, visto que resultados de CV interensaios menores do que 5% apresentam repetibilidade adequada, o que sugere que a técnica qPCR para detecção e quantificação de *S. agalactiae* pode ser utilizada. Os CV intra-ensaios para a amostra de leite (com a maior concentração do patógeno (2×10^5 UFC/mL) foram de 0,57 e 1,23%, nos dias A e B,

respectivamente. Quando considerada a amostra A com menor concentração de *S. agalactiae* (9×10^2 UFC/mL), os CV intra-ensaios foram de 1,89 e 0,07%, respectivamente, nos dias A e B, em que toda a metodologia foi executada. A variação dos resultados obtidos entre os dois dias (interensaio) em que a metodologia foi executada foi de 2,87% para a amostra F contendo 2×10^5 UFC/mL de *S. agalactiae*, e de 4,56% para a amostra A contendo 9×10^2 UFC/mL da bactéria (Tabela 5).

Tabela 5 - Repetibilidade da técnica qPCR calculado por meio dos coeficientes de variação intra e interensaios da qPCR.

Amostra	Cont. de <i>S. agal.</i> ^a	Ensaio dia 1 ^b			Ensaio dia 2 ^b			CV 1,2 ^e (%)
		Ct ^c A'	Ct ^c A''	CV ^d A(%)	Ct ^c B'	Ct ^c B''	CV ^d B(%)	
A	9×10^2	22,10	22,70	1,89	21,01	20,99	0,07	4,56
B	$1,7 \times 10^3$	31,18	31,64	1,04	31,02	30,14	2,03	1,89
C	$3,2 \times 10^3$	29,35	31,86	5,80	28,55	28,27	0,70	5,26
D	5×10^3	29,04	28,77	0,66	28,46	29,10	1,57	0,31
E	$3,3 \times 10^4$	25,97	25,88	0,25	26,26	25,76	1,36	0,23
F	2×10^5	23,75	23,56	0,57	24,42	24,85	1,23	2,87
Média				1,70			1,16	2,52

^aContagem de *S. agalactiae* (ATCC 13813) (UFC/mL).

^bEnsaio A' e A'', B' e B'', da mesma amostra realizada em dois dias diferentes.

^cCiclo em que ocorreu a amplificação da amostra durante a reação de qPCR, do ensaio em questão.

^dCoefficiente de variação entre os Ct's obtidos dos ensaios A' e A'', e B' e B'' (CV intra-ensaio).

^eCoefficiente de variação entre os Ct's obtidos dos ensaios executados nos dias 1 e 2 (CV interensaio).

As médias dos CV intra-ensaios foram de 1,70% e de 1,16%. Com base nesses resultados, foi possível inferir que o método sugerido apresenta repetibilidade adequada (VALLAT; EDWARDS, 2008) para a contagem de *S. agalactiae* em amostras de leite, com contagens variando entre 9×10^2 e 2×10^5 UFC/mL de bactéria. Os maiores coeficientes de variação do interensaio foram verificados nas amostras A (9×10^2 UFC/mL) e C ($3,2 \times 10^3$ UFC/mL), 4,56% e 5,26%, respectivamente (Tabela 4).

4.8 EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE REFERÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO *STREPTOCOCUS AGALACTIAE* EM AMOSTRAS DE LEITE

A análise de Bland-Altman foi utilizada para avaliar o nível de concordância entre os dois métodos e comparar o qPCR à metodologia de referência. O resultado da análise entre os métodos, para a determinação da contagem de *S. agalactiae*, em amostras de leite de vacas e de tanque, está apresentado nas figuras 11, 12, 13 e 14.

4.8.1 Amostras de leite de tanque

A representação gráfica da dispersão das duas mensurações de contagem de *S. agalactiae* em leite de tanque obtidas por meio dos métodos de referência e de qPCR está representada na (Figura 11).

Figura 11 - Identities entre as contagens de *S. agalactiae* (em log10UFC/mL) obtidas pelos métodos de qPCR [(UFC/mL) estimado] e de referência de cultura microbiológica [(UFC/ml) medido].

A magnitude das diferenças entre as contagens do patógeno obtidas de amostras de leite de tanque por meio dos métodos de contagem em placas e estimadas pelo qPCR, em $\log_{10}$ UFC/mL, em relação à média de resultados obtidos entre os dois métodos é observada na figura 11. Os dados deveriam ter dispersão constante ao longo da linha de identidade (BLAND; ALTMAN, 2010), entretanto, a diferença média entre as duas formas de mensuração foi significativa ($P < 0,0001$) e, portanto, foram considerados métodos diferentes de quantificar *S. agalactiae* em amostras de leite de tanque e não podem ser usadas de forma equivalente (Figura 12).

Figura 12 - Média entre os resultados de contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) em função das diferenças observadas entre os resultados obtidos pelos dois métodos (ambos em $\log_{10}$ UFC/mL). O Bias (0,86) é a diferença média entre os valores de UFC/ml por ambos métodos e os valores limites de concordância entre eles variaram de -2,90 a 1,17.

4.8.2 Amostras de leite de vaca

A dispersão de duas mensurações de contagem de *S. agalactiae* de leite de vaca obtidas por meio dos métodos de referência (representado no eixo x) e de qPCR (representado no eixo y), sem os desvios observados entre as medidas são apresentadas na figura 13.

Figura 13 - Gráfico de identidade entre as contagens de *S. agalactiae* (em log₁₀UFC/mL) obtidas pelos métodos de qPCR [(UFC/ml) estimado] e de referência de cultura microbiológica [(UFC/ml) medido].

As diferenças entre as contagens do patógeno obtidas de amostras de leite de vaca pelos métodos de contagem em placas e estimadas pelo qPCR, em log₁₀UFC/mL, em relação à média de resultados obtidos entre os dois métodos está representada na figura 13. Os dados deveriam ter dispersão constante ao longo da linha de identidade (BLAND; ALTMAN, 2010), entretanto, a diferença média entre as duas formas de mensuração foi significativa ($P < 0,0001$) e, portanto, foram consideradas formas diferentes de quantificar *S. agalactiae* em amostras de leite de vaca e não apresentaram equivalência (Figura 14).

Por outro lado, apesar das contagens de *S. agalactiae* obtidas de amostras de leite de tanque e de vacas, analisadas por meio da técnica de qPCR e pela metodologia de referência, não terem sido equivalentes, as contagens de *S. agalactiae* ATCC 13813 por qPCR nas

amostras de leite artificialmente contaminadas apresentaram correlação e significância ($r=0,97$; $P<0,001$) com a metodologia de referência.

Figura 14 - Representação gráfica da média entre os resultados de contagem de *S. agalactiae* (UFC/ml) de em função das diferenças observadas entre os resultados da contagem do patógeno obtidos pelos dois métodos (ambos em log₁₀UFC/mL). O Bias (2,80) é a diferença média entre os valores de UFC/mL por ambos métodos e os valores limites de concordância entre eles variaram de -5,49 a -0,11.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado a equivalência da metodologia qPCR em quantificar *S. agalactiae* (UFC/ml) em amostras de leite comparando com a técnica de contagem em placa em meio Edwards, considerada metodologia de referência. Para isso, foi construída uma curva padrão, com o uso da cepa de *S. agalactiae* ATCC 13813, na qual foi possível construir uma equação, em que os valores de quantificação da qPCR (Ct) eram aplicados para estimar as contagens de *S. agalactiae* em leite bovino (vaca e tanque). Por meio do procedimento diagnóstico de qPCR foi possível detectar a espécie de *S. agalactiae* diretamente do leite. Por outro lado, apesar da técnica de qPCR ser muito utilizada na quantificação de bactérias em alimentos, como leite e derivados de leite (ZADOKS et al., 2005; POSTOLLEC et al., 2011), os valores de contagem (estimado) e contagem (medido) de *S. agalactiae* de amostras de leite de vaca e de tanque não foram equivalentes quando comparadas as duas metodologias propostas no presente estudo. Adicionalmente, foi determinada a sensibilidade analítica e a repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR em relação à cultura microbiológica para detecção de *S. agalactiae* em amostras compostas de leite e de tanque. A detecção de *S. agalactiae* pode ser realizada pela técnica de qPCR em faixas de diluição de 10^{-4} a 10^{-7} UFC/ml (sensibilidade analítica), e também, por ter apresentado repetibilidade adequada (média de CV interensaio <5%).

Neste estudo, o isolamento microbiológico de *S. agalactiae* foi realizado em 83,9% das amostras individuais de leite de vaca e em 28% de amostras de leite de tanque. Provavelmente este resultado de alta prevalência de *S. agalactiae* foi devido as amostras de leite de vaca já terem diagnóstico prévio com *S. agalactiae*, no entanto após uma reconfirmação por cultura microbiológica, 5 amostras (16%) foram diagnosticadas como *Streptococcus* spp. Este resultado é explicado por Santos et al. (2006) que sugerem que a maioria dos laboratórios considera que todos os isolados com características de “cocos gram-positivos catalase negativo” pertencem ao gênero *Streptococcus* spp. No caso das amostras de leite de tanque, o percentual de frequência de isolamento de *S. agalactiae* foi similar ao de Tenhagen et al. (2006) de 29%, porém diferiu do percentual descrito Jayarao et al. (2004) de 10%; por Keefe et al. (1997), que identificaram 17,7% e 13% de *S. agalactiae* de leite tanque em dois períodos diferentes; e por Elias et al. (2012) de 39% no Brasil.

Todas as amostras de leite de tanque utilizadas no presente estudo foram originárias de rebanhos leiteiros com histórico de CCS acima de 600.00 células/mL. Jayarao et al. (2004)

utilizaram como limite de alta CCS valores acima de 400.000 células/mL, desta forma esta seria uma possível razão para a maior frequência de *S. agalactiae* em amostras de leite de tanque com maior valor de CCS (BARKEMA et al., 1998; JARAYAO et al., 2004), assim como, em geral patógenos contagiosos tendem a aumentar a CCS de leite de tanque (RYSANEK et al., 2009), o que justificaria o percentual encontrado do micro-organismos em estudo.

As médias de contagem de *S. agalactiae* de leite de vaca e de tanque foram $4,313 \times 10^3$ e $1,902 \times 10^4$ UFC/ml, respectivamente. A contagem de *S. agalactiae* das amostras de leite de vaca e de tanque foi realizada com o propósito de comparação aos resultados da metodologia da qPCR. As informações sobre contagens de *S. agalactiae* podem auxiliar na estimativa da intensidade da resposta imune na glândula mamária frente à infecção, pois depende do agente causador (Le Roux et al., 2003) e do grau em que este coloniza a glândula mamária (Costa et al., 1995). Por outro lado, a contagem média de *S. agalactiae* de leite de tanque do presente estudo diferiu da contagem média de $7,77 \times 10^2$ UFC/mL descrito por Elias et al. (2012). Provavelmente, a alta contagem de *S. agalactiae* difere das contagens de outros estudos, pois a prevalência de patógenos contagiosos causadores de mastite isolados em tanque seja maior em rebanhos brasileiros (BRITO et al., 1998). Além disso, *S. agalactiae* encontrado no leite de tanque ser advindo exclusivamente do interior do tecido mamário de vacas infectadas (Keefe, 1997), o que torna importante o diagnóstico microbiológico do leite de tanque para o rastreamento deste micro-organismo no rebanho (Brito et al., 1998).

A extração de DNA direto do leite foi padronizada para *S. agalactiae* e para tanto foram testadas alguns protocolos, principalmente porque, a técnica qPCR por ser qualitativa e quantitativa demanda maior cuidados no procedimento de extração, a exemplo da padronização do volume das amostras e reagentes utilizados na reação. Cremonesi et al. (2006) utilizaram extração de DNA direto de amostras de leite e similar ao observado no presente estudo, descreveram dificuldades associadas na execução deste protocolo. A baixa concentração do DNA do patógeno (SEARS et al., 1990), os fatores relacionados ao grau de lise celular e exposição de ácido nucleico, e a presença de substâncias inibitórias (TAPONEN et al., 2009) derivadas do leite (cálcio, proteinases, gordura e caseína) são os pontos críticos associados à extração de DNA direto do leite (CREMONESI et al., 2006). Adicionalmente, Elias et al. (2012) descreveram um protocolo ideal de extração de DNA direto do leite deve ser eficiente ao ponto de lisar paredes bacterianas sem danificar o DNA alvo.

Para a confirmação da extração de DNA, foi utilizado protocolo com amostras testes e amplificação por meio do conjunto de primer's BMCB conforme Botaro et al. (2012), pois a

metodologia de extração do presente estudo não apresentava leitura adequada no equipamento NanoDrop, que mensura a concentração de DNA extraído. Outro fato que pode ter impedido a mensuração da concentração de DNA por espectrofotometria, provavelmente, esta associado à presença de substâncias inibidoras de PCR no leite que prejudicam a extração do DNA, como descrito por Cremonesi et al. (2006).

A qPCR foi sugerida como um método de quantificação de populações microbianas em alimentos (POSTOLLEC et al., 2011), diferente de técnicas convencionais de PCR que apenas identificam os micro-organismos. Alguns estudos demonstraram a importância do uso da qPCR em amostras de leite (KATHOLM et al., 2012), por apresentar alta sensibilidade na detecção de patógenos causadores IIM. No presente estudo, foi utilizado um teste de controle interno para avaliação da técnica de quantificação de DNA. Este teste consistiu em diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-10}) do DNA extraído de uma alíquota de cepa padrão de *S. agalactiae*, com o objetivo da mensuração dos valores de quantificação pela técnica qPCR (Ct). Segundo Katholm et al. (2012), Ct é o número de ciclos que a reação requer para amplificação de ácido nucleico, detectado por fluorescência, e que consequentemente representa a quantificação do DNA alvo (NOVAIS et al., 2004). Diante disso, foi possível estimar por meio de regressão linear, correlação inversamente proporcional, entre as variáveis Ct e a concentração de DNA, o que está de acordo com os resultados de Novais et al. (2004), Postollec et al., (2011) e Katholm et al. (2012).

Foi construída uma curva para avaliar a sensibilidade analítica do método, que detectou, nas mesmas condições utilizadas pelo presente estudo, contagens de *S. agalactiae* em faixas de 3×10^2 à $3,2 \times 10^5$ UFC/mL (diluições de 10^{-4} a 10^{-7}). Esta curva foi construída, principalmente, vista a necessidade de mesmas unidades de comparação este as metodologias avaliadas, isto é, foi necessário comparar a contagem de *S. agalactiae* (estimada) à contagem de *S. agalactiae* (medida). Os resultados da curva padrão e da equação de regressão, apresentados neste estudo, foram semelhantes à metodologia utilizada por Botaro et al (2012). Entretanto, Gillespie e Oliver et al. (2005) construíram uma curva padrão, baseada em metodologia Multiplex qPCR que diferiu das do estudo em questão, em que a sensibilidade de detecção apresentada variou de 10^0 e 10^8 UFC/mL.

Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus* e as espécies de *Mycoplasma* são os principais micro-organismos contagiosos isolados do leite de vacas e de tanque. Justice-Allen et al. (2011) e Botaro et al. (2012) construíram uma curva padrão para *S. aureus* e *Mycoplasma* spp., respectivamente, no intuito de comparar as contagens (UFC/mL), encontradas pela metodologia de contagens em placa e contagem estimada pela equação

desenvolvida. Embora, diversos estudos avaliaram na detecção de patógenos contagiosos por meio do uso de qPCR, nenhum deles estimou a correlação entre as duas metodologias para *S. agalactiae*.

As contagens de *S. agalactiae* (UFC/ml medido) foram comparados aos valores de UFC/mL (estimado) de acordo com a metodologia proposta por Botaro et al. (2012). Diferenças entre as médias de UFCs (medido – estimado), para leite vaca e de tanque, foram 103,26% (4453 UFC/mL) e 26,78% (24.122 UFC/mL), respectivamente. Estas diferenças entre as contagens podem ter ocorrido pela maior sensibilidade da qPCR (PHUEKTES et al., 2003; CREMONESI et al., 2006; KATHOLM et al., 2012), quando comparado à metodologia convencional de contagem em placa, em que apenas é possível a contagem de células viáveis.

A técnica qPCR para a contagem de UFC/mL de *S. agalactiae* de leite de vaca e de tanque não foi equivalente a metodologia de referência, de acordo com os resultados do presente estudo. A correlação entre as contagens de *S. agalactiae* estimadas e medidas, por meio da equação de regressão, foi significativa apenas para as amostras de leite de tanque, em que 29% da contagem de *S. agalactiae* feita pela metodologia referência foram correlacionadas ao resultado da contagem de *S. agalactiae* estimada. Por outro lado, quando foi realizada a comparação entre as duas metodologias pelo teste de Bland-Altman $P < 0,0001$, as duas metodologias não foram equivalentes para a quantificação de *S. agalactiae* oriundos de leite de vaca e de tanque. Botaro et al. (2012) apresentaram resultados similares aos do presente estudo, mas com avaliação de *S. aureus*. A não equivalência poderia ter ocorrido em razão da presença de *S. agalactiae* mortos ou não cultiváveis em algumas das amostras de leite, pois existe a ação de mecanismos da imunidade celular e humoral do hospedeiro sobre a viabilidade do patógeno causador da mastite, ainda que não se manifeste a infecção (GILLESPIE, OLIVER, 2005).

Os coeficientes de variação inter e intraensaios da qPCR entre amostras de leite de tanque selecionadas a partir de valores de menor e maior contagem de *S. agalactiae* foram calculados segundo (BUSTIN, 2005). Pela análise dos CV intra e interensario foi possível inferir que o método sugerido apresentou repetibilidade adequada. Estes resultados de repetibilidade foram similares ao de Graber et al. (2007) e Botaro et al. (2012), que apesar de utilizarem *S. aureus* com objeto de estudo encontram CV interensaio $< 5\%$.

Não foram utilizados neste estudo amostras de leite de tanque que representavam as amostras de vacas, ou seja, as amostras de leite de tanque não eram provenientes das mesmas vacas utilizadas para a coleta de amostras individuais. Além disso, não foram mensurados apenas o DNA de bactérias viáveis com o uso da técnica de biologia molecular, como

sugerido por Nogva et al. (2003). Provavelmente, estes fatores podem ter contribuído para a não equivalência de resultados entre as duas metodologias utilizadas, o que poderia ser considerado como limitações do presente estudo. Embora a presença de fatores limitantes associados ao estudo em questão, recomenda-se que futuros estudos envolvendo técnicas de qPCR para quantificação de bactérias, como por exemplo *S. agalactiae*, utilizem número maior de amostras de leite de vaca e de tanque, e que sejam representativas do mesmo rebanho, e também, o uso de metodologias de biologia molecular que estrategicamente possibilitem a contagem de apenas células viáveis, como sugerido por Nocker et al. (2006) e Taskin et al. (2011) que propuseram a utilização de brometo de etídeo monoazídico para inibir a amplificação por PCR do DNA de bactérias mortas.

6 CONCLUSÃO

A contagem de *S. agalactiae* realizada por cultura microbiológica em placas não é equivalente aos resultados de contagem de *S. agalactiae* estimados por qPCR. A sensibilidade analítica de detecção de *S. agalactiae* realizada pela técnica de qPCR foi entre as diluições de 10^{-4} a 10^{-7} UFC/ml. Foi possível demonstrar que a técnica de qPCR na detecção de *S. agalactiae* apresenta repetibilidade adequada.

REFERÊNCIAS

- BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 274-281, 2004.
- BARHEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 411-419, 1998.
- BARHEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4717-4729, 2009.
- BARTLETT, P. C.; VAN WIJK, J.; WILSON, D. J.; GREEN, C. D.; MILLER, G. Y.; MAJEWSKI, G. A.; HEIDER, L. E. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1561-1572, 1991.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **International Journal of Nursing Studies**, v. 47, n. 8, p. 931-936, 2010.
- BOTARO, B. G. **Detecção e contagem de Staphylococcus aureus causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **In Practice**, v. 27, n. 6, p. 310-315, 2005.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, Incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847-850. 2000.
- BRITTEN, A. M. The Role of Diagnostic Microbiology in Mastitis Control Programs. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, p. 187-202, 2012.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. 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.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 129-135, 1999.

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 1-45, v, 2003.

BUSTIN, S. A. **A-Z of quantitative PCR. . La Jolla, California:** International University Line, 2004

CASSOLI, L. D.; FRANCISCHETTI, G.; MACHADO, P. F.; MOURÃO, G. B. The relationship of flow cytometry results with classical measures of bacterial counts in raw refrigerated milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 297-300, 2010.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J.; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 623-634, 2004.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 156-158, 1995.

CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 163-169, 2006.

DE Vlieghe, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S.; MCDougall, S.; BARKEMA, H. W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.

DINSMORE, R. P.; ENGLISH, P. B.; GONZALEZ, R. N.; SEARS, P. M.; SCHULTE, H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1521-1526, 1991.

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cell counts in bovine milk. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 119-125, 1982.

EBERHART, R.J.; HUTCHINSON, L. J.; SPENCER, S. B. Relationship of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and indices of herd production. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 1125-1128, 1982.

EDMONDSON, P. Practical use of bulk tank analysis for mastitis and milk quality problems. In: Nacional Mastitis Council. Annual Meeting ,44 , 2005. Verona. Proceedings WI: National Mastitis Council, 2005. p. 94-100.

ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDAO, P. E.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 34-38, 2012.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÄNSSON, H.; ANDRÉN, A.; AKERSTEDT, M.; ANDRÉE, L.; SVENLNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3569-3577, 2010.

FORSMAN, P.; TILSAIA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v. 143, n. 11, p. 3491-3500, 1997.

FUKUSHIMA, H.; KATSUBE, K.; HATA, Y.; KISHI, R.; FUJIWARA, S. Rapid Separation and Concentration of Food-Borne Pathogens in Food Samples Prior to Quantification by Viable-Cell Counting and Real-Time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 92-100, 2007.

GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3510-3518, 2005.

GODDEN, S.; BEY, R.; FARNSWORTH, R.; RENEAU, J.; LAVALLE, M. Field validation of a milk line sampling device for monitoring milk quality and udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1468-1475, 2002.

GONZALO, C.; MARTÍNEZ, J. R.; CARRIEDO, J. A.; SAN PRIMITIVO, F. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 138-145, 2003.

GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X.; KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

HALASA, T.; NIELEN, M.; DE ROOS, A. P.; VAN HOORNE, R.; DE JONG, G.; LAM, T. J.; VAN WERVEN, T.; HOGVEEN, H. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 599-606, 2009.

HALASA, T. Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5740-5749, 2012.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, p. 18-31, 2007.

HOGAN, J.S.; GONZÁLEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Verona: National Mastitis Council, 2005. 222 p.

HOGAN, J. S.; GONZALEZ, R. N.; HARMON, R. J.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; PANKEY, J. W.; SMITH, K. L. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

JAYARAO, B. M.; WOLFGANG, D. R. Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, p. 75–92, 2003

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3561-3573, 2004.

JIAN, G.; XIU-QUAN, L.; ZHI, W.; JING-LIANG, S.; BO, H. Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of *S. aureus* Isolated from Bovine Mastitis. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v. 42, n. 4, p. 538-543, 2011.

JUSTICE-ALLEN, A.; TRUJILLO, J.; GOODELL, G.; WILSON, D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3411-3419, 2011.

KATHOLM, J.; BENNEDSGAARD, T. W.; KOSKINEN, M. T.; RATTENBORG, E. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5702-5708, 2012.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.

KELTON, D.; GODKIN, A. Mastitis culture programs for dairy herds. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 39, 2000, Atlanta. **Proceedings...**Madison: National mastitis Council, 2000. V.39, p. 54–62.

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

KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, S.; BREDBACKA, P.; PITKALA, A.; BARKEMA, H. W.; BEXIGA, R.; ROBERSON, J.; SOLVEROD, L.; PICCININI, R.; KELTON, D.; LEHMUSTO, H.; NISKALA, S.; SALMIKIVI, L. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 952-959, 2009.

KOSKINEN, M. T.; WELLENBERG, G. J.; SAMPIMON, O. C.; HOLOPAINEN, J.; ROTHKAMP, A.; SALMIKIVI, L.; VAN HAERINGEN, W. A.; LAM, T. J.; PYORALA, S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5707-5715, 2010.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, p. 629-645, 2003.

LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; COSTA, G. M.; ROCHA, C. M. B. M.; ABREU, L. R.; SANTOS, G.; FRANCO NETO, A. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 493-499, 2011.

LOSINGER, W. C. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 4, p. 425-432, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**. 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 maio 2013.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3466-3472, 2003.

MEIRI-BENDEK, I.; LIPKIN, E.; FRIEDMANN, A.; LEITNER, G.; SARAN, A.; FRIEDMAN, S.; KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1717-1723, 2002.

MEYER, R.; LÜTHY, J.; CANDRIAN, U. Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 268-271, 1991.

MINST, K.; MARTLBAUER, E.; MILLER, T.; MEYER, C. Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6957-6962, 2012.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of Bovine Mastitis**. 3 ed. Madison: WI, NMC Inc., 1996. p.64.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**, 4. ed. Madison: WI, NMC Inc., 2004. p. 1-47.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.-Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 310-320, 2006.

NOGVA, H. K.; DROMTORP, S. M.; NISSEN, H.; RUDI, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **Biotechniques**, v. 34, n. 4, p. 803-812, 2003.

NOVAIS, M. C.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVER, S. P.; KING, S. H.; LEWIS, M. J.; TORRE, P. M.; MATTHEWS, K. R.; DOWLEN, H. H. Efficacy of Chlorhexidine as a Postmilking Teat Disinfectant for the

Prevention of Bovine Mastitis During Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2230-2235, 1990.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H. H.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; CHESTER, S. T.; MOSELEY, W. M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2393-2400, 2004.

OVIDO-BOYSSO, J.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; CAJERO-JUAREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LOPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATINO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1140-1148, 2001.

RYSANEK, D.; BABAK, V.; ZOUHAROVA, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 6, p. 223-230, 2007.

RYSANEK, D.; ZOUHAROVA, M.; BABAK, V. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 1, p. 117-123, 2009.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* and related genera as etiological agents of bovine mastitis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2006.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole. 2007. 314p.

SCHUKKEN, Y. H.; de LEEMPUT, E. S.; MORONI, P.; WELCOME, F.; GURJAR, A.; ZURAKOWSKI, M.; GUTIERREZ, C.; CEBALLOS, A.; ZADOKS, R. Contagious or environmental – A herd diagnosis. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 27., 2012 Lisboa, Portugal, **Anais...** Lisbon: Lisbon Congress Center, 2012. p. 145-148.

SEARS, P. M.; SMITH, B. S.; ENGLISH, P. B.; HERER, P. S.; GONZALEZ, R. N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2785-2789, 1990.

SHARMA, N.; SINGH, N. K.; BHADWAL, M. S. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 429-438, 2011.

SOUZA, G. N.; CARVALHO, A. C.; MENDONÇA, L. C. Qualidade do leite. In: **Manual de bovinocultura de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010. cap. 12, p. 541-606.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M. T.; PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2610-2617, 2009.

TASKIN, B.; GOZEN, A. G.; DURAN, M. Selective quantification of viable *Escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4329-4335, 2011.

VILLANUEVA, M. R.; TYLER, J. W.; THURMOND, M. C. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 8, p. 1398-1400, 1991.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 254-298, 2006.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 27-45, 2002.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.

ZADOKS, R. N.; SCHULTE, H. F.; TIKOFSKY-GARRISON, L. L. **Molecular tools enhance the value of bulk tank milk monitoring**. ANNUAL MEETING NACIONAL MASTITIS COUNCIL, 44, 2005. New York, **Proceedings**, 2005, p. 86-93.

ZADOKS, R. N.; GONZALEZ, R. N.; BOOR, K. J.; SCHUKKEN, Y. H. Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2644-2650, 2004.