JULIANO LEONEL GONÇALVES

Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.

**Pirassununga
2012**

JULIANO LEONEL GONÇALVES

Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.

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. Phd. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2012

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.2667
FMVZ

Gonçalves, Juliano Leonel

Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por
Corynebacterium spp./ Juliano Leonel Gonçalves. -- 2012.
128 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal,
Pirassununga, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Infecção intramamária. 2. *Corynebacterium* spp. 3. Composição. 4. Produção.
5. Espectrometria de massas. 6. Sequenciamento de genes. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.", protocolado sob o nº 2231/2011, utilizando 1200 (vacas), 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 22/6/2011.

We certify that the Research "Production and milk composition in dairy cows with mastitis caused by *Corynebacterium* spp.", protocol number 2231/2011, utilizing 1200 (One thousand, two hundred) cows, 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 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

ERRATA

GONÇALVES, J. L. Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp. 2012. 128 p.
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	1º	do leite em vacas	do leite de vacas
Folha de Avaliação	2º	do leite em vacas	do leite de vacas
Abstract	1º	do leite em vacas	do leite de vacas

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GONÇALVES, Juliano Leonel

Título: Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.

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 as duas pessoas mais importantes de minha vida.

Estas que sempre me deram carinho e amor, que estiveram ao meu lado em todos os momentos e ensinaram-me o respeito, a humildade, a disciplina e o compromisso.

Eles que são meu maior orgulho e exemplo.

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais.

Dauri Gonçalves e Maria Aparecida Leonel Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta conquista.

À toda a minha família que sempre me incentivou nesta longa caminhada. As minhas avós Marta e Maria, pelas orações encaminhadas. Obrigado pelo amor e por acreditarem em mim. Aos meus pais, Dauri Gonçalves e Maria Aparecida Leonel Gonçalves, pela torcida incansável e por serem meu exemplo de respeito à Deus e de luta pela vida. À minha irmã, Bruna Leonel Gonçalves e ao meu tio, André Ari Leonel pelos conselhos, pela força, pelos momentos de risadas e bagunças juntos.

A minha família adotiva, a Keila, Leila, Paulo, Márcio, Damariz, Gutierrez e, em especial, a minha amiga Noemi por todos os momentos em que compartilhamos juntos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos pela orientação e ensinamentos. Obrigado por esta oportunidade de trabalho a qual me agregou muitos conhecimentos e experiências que foram essenciais para minha formação profissional.

Ao prof. Dr. Marcos Eberlim e todos os meus amigos do Laboratório ThoMSon (UNICAMP), em especial, à Christina, Vanessa, Alessandra e Patrícia, pelo carinho, recepção e parceria. E acima de tudo, por acreditarem na concretização desta pesquisa junto conosco.

Aos professores Dr. João Pessoa, Vera e Terue, por me acolher no campus da UNESP em Botucatu e permitir a continuidade dos trabalhos deste projeto. Muito obrigado pela paciência e orientação, sem as quais não teria concluído a pesquisa.

Aos pesquisadores, Juliana Regina Barreiro e Tiago Tomazi, pelo gesto grandioso em me ajudar nas coletas das amostras e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigado pelos momentos de conselhos, pelo ombro amigo, por me fazer rir quando tudo parecia estar perdido e por me ensinar lições de vida. À vocês meus amigos, meu muito obrigado.

À todos os meus amigos do laboratório de TPOA da FMVZ/USP, Marco Aurélio Porcionato, Bruno Botaro, Cristina Cortinhas, Daniele Beuron, Nara Oliveira, Elmeron de Jesus (Mineiro), Luiz Henrique, Susana Macedo, Marina Migliano, Camila Silano e Marcos Arcari pelos bons momentos de convivência e também de estresse. A eles ainda, agradeço com imenso carinho o fato de nunca hesitarem esforços em colaborar com este trabalho.

Aos especialistas do laboratório TPOA da FMVZ/USP, José Francisco Garcia Moreno e Lucinéia Mestieri, que contribuíram nas análises laboratoriais. Obrigado pela paciência e amizade.

À todos os meus amigos da UNESP Botucatu, em especial, o Flávio Paz, Lidiany A. Linhares, Danilo, Carlos, Rafael e Mariana pela força que me deram durante a pesquisa.

Ao prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira e seus orientados (Natali, Keliani e Sarah) pela ajuda cedida e amizade. À Sarah em especial pelo companheirismo e convivência.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPQ pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto.

Aos estagiários, Natália, Marina e Marcos pela ajuda e dedicação durante o experimento.

Ao Laboratório Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP pela parceria e realização das análises laboratoriais.

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Produção animal da FMVZ/USP pela parceria e realizações das análises. Em especial, muito obrigado à Alessandra, João Paulo, Lurdes, Maria e Suelen.

Aos proprietários por sempre nos receber durante o período de coleta.

À todos que aqui não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

EPIÍGRAFE

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse caridade, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que eu tivesse o dom de profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse caridade, nada seria.”.

Paulo de Tarso
(I Coríntios, 13: 1e 2.)

RESUMO

GONÇALVES, J. L. **Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.** [Milk yield and composition of cows with subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp.]. 2012. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

A mastite é a inflamação da glândula mamária cuja causa mais comum são as infecções bacterianas. É considerada a doença de maiores prejuízos e prevalência em vacas leiteiras. A forma subclínica da mastite é o tipo mais predominante de infecção intramamária (IIM), sendo *Corynebacterium* spp. um dos agentes mais frequentemente isolados. Portanto, os objetivos gerais deste estudo foram: 1) avaliar o efeito de IIMs subclínicas causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários; 2) determinar o efeito da IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre o teor de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total, extrato seco desengordurado do leite e contagem de células somáticas (CCS); 3) avaliar a técnica de Espectrometria de massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI/TOF-MS) para a identificação das espécies de *Corynebacterium* isoladas de quartos mamários. Foram utilizados 21 rebanhos leiteiros (n=1.242 animais), nos quais foram selecionadas vacas em lactação previamente identificadas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. (n=285). Amostras de leite de quartos mamários de vacas previamente identificadas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. (n=1.140) foram coletadas, identificadas por meio de cultura microbiológica e criopreservadas. Os isolados de *Corynebacterium* spp. (n=351) foram descongelados, recultivados e submetidos à identificação pela técnica de sequenciamento de genes 16S rRNA (*standard gold*) e MALDI/TOF-MS. Para a análise de MALDI/TOF-MS, os isolados bacterianos foram submetidos a protocolo de extração em tubo, baseado no uso de ácido fórmico. Do total de quartos mamários infectados por *Corynebacterium* spp. (n=190) identificados pelo sequenciamento de genes 16S rRNA, 46 quartos mamários apresentaram contralaterais sadios (controle). Para a coleta de amostras de leite para composição e CCS, as vacas foram submetidas à ordenha completa e individual dos quartos mamários. Foi avaliado o efeito de IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre a produção e a composição do leite, utilizando delineamento em parcelas subdivididas em faixas (*strip-plot*). Todos os quartos mamários infectados por *Corynebacterium* spp. (n=190) apresentaram média de CCS de 690×10^3 células/mL. Dentre os quartos contralaterais, a CCS foi maior para os quartos com IIM causada por *Corynebacterium* spp. (194×10^3 células/mL) que em quartos não infectados

(81×10^3 células/mL). Não houve efeito de *Corynebacterium* spp. sobre a produção de leite, gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado. Um total de 222 isolados foram identificados pela MALDI/TOF-MS como *Corynebacterium* spp., dos quais, *Corynebacterium bovis* foi o mais frequentemente isolado (n = 208). Espécies não-lipofílicas representaram 4,5% do total de isolados (n=10), destes *C. auriscanis* (n=3), *C. xerosis* (n=3), *C. amycolatum* (n=1), *C. casei* (n=1), *C. efficiens* (n=1), *C. pseudotuberculosis* (n=1). Apenas quatro amostras (1,8%) não foram identificadas ao nível de espécie, *Corynebacterium* spp. Houve equivalência de resultados de 95% entre as duas técnicas de identificação utilizadas. Em conclusão, IIMs causadas por *Corynebacterium* spp. não apresentam efeito sobre a produção e composição de leite, porém apresentam aumento significativo da CCS. Adicionalmente, a técnica de MALDI/TOF-MS com o uso da extração em tubo por ácido fórmico/acetonitrila foi aplicada com 91,57% de sensibilidade de identificação das espécies de *Corynebacterium* nos casos de mastite bovina subclínica, quando comparado aos resultados do sequenciamento de genes 16S rRNA.

Palavras-chave: Infecção intramamária. *Corynebacterium* spp. Composição. Produção. Espectrometria de massas. Sequenciamento de genes.

ABSTRACT

GONÇALVES, J. L. **Milk yield and composition of cows with subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp.** [Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.]. 2012. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Mastitis is an inflammation of the mammary glands which bacteria are the most common cause of infections. It is considered a disease with higher prevalence and losses in dairy cows. The subclinical form of mastitis is the most prevalent type of intramammary infection (IMI), and *Corynebacterium* spp., one of the agents most frequently isolated. Therefore, the main objectives of this study were: 1) to evaluate the effect of subclinical IMI caused by *Corynebacterium* spp. on milk composition and yield of mammary quarters; 2) to determine the effect of IMI caused by *Corynebacterium* spp. on the concentration of fat, protein, lactose, casein, total solids, non fat dry milk and somatic cell count (SCC); 3) to evaluate the technique of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight - Mass Spectrometry (MALDI/TOF-MS) for species identification of *Corynebacterium* isolated from mammary glands. Twenty-one dairy herds were used (n = 1242 animals) on which lactating cows were selected previously identified with IMI caused by *Corynebacterium* spp. (n = 285). Samples of milk from mammary glands of cows previously identified with IMI caused by *Corynebacterium* spp. (n = 1140) were collected, identified by microbiological culture and cryopreserved. The strains of *Corynebacterium* spp. (n = 351) were thawed and recultivated which were submitted for identification by the technique of sequencing 16S rRNA (gold standard) and MALDI/TOF-MS. For analysis of MALDI/TOF-MS, the isolates were subjected to tube-extraction protocol based on the use of formic acid and acetonitrile. Of the total number of mammary quarters infected by *Corynebacterium* spp. (n = 190) identified by sequencing 16S rRNA genes, 46 showed contralateral healthy mammary quarters (control). For the collection of milk composition samples and SCC, cows were submitted to a complete milking in individual mammary quarters. The effect of IMI caused by *Corynebacterium* spp. on milk yield and composition were analyzed using *strip-plot* design. All mammary quarters infected with *Corynebacterium* spp. (n = 190) had mean of CCS 690×10^3 cells/mL. Among the contralateral quarters, CCS was higher in quarters with IMI caused by *Corynebacterium* spp. (194×10^3 células/mL) comparing with uninfected quarters (81×10^3 cells/mL). There was no effect of *Corynebacterium* spp. on milk yield, on the concentration of fat, protein, casein, lactose, total solids and solids not fat. A total of 222 isolates were identified by MALDI/TOF-

MS as *Corynebacterium* spp. of which, *Corynebacterium bovis* were the most isolated (n = 208). Species non-lipophilic represented 4.5% of isolates (n = 10) of these *C. auriscanis* (n = 3), *C. xerosis* (n = 3), *C. amycolatum* (n = 1), *C. casei* (n = 1), *C. efficiens* (n = 1), *C. pseudotuberculosis* (n = 1). Only four samples (1.8%) were not identified to the species level. There were equivalence results of 95% between the two identification techniques used. In conclusion, IMI caused by *Corynebacterium* spp. have no effect on milk yield and composition, but exhibit a significant increase in CCS. Additionally, the technique of MALDI/TOF-MS using the tube-extraction by formic acid/acetonitrile was applied with 91.57% sensitivity for identifying the species of *Corynebacterium* on cases of bovine mastitis subclinical when compared to the results of genes sequencing 16S rRNA.

Key words: Intramammary inflammation. *Corynebacterium* spp. Composition. Production. Mass spectrometry. Gene sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação entre o fluxo de trabalho de identificação pela MALDI/TOF-MS e o SeqGEN por amostra	79
Figura 2. Eletroferograma que sugere a presença de mais de uma espécie de <i>Corynebacterium</i> spp.....	84
Figura 3 - Fluxo de coleta de amostras compostas e por quartos mamários para isolamento, composição e CCS.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes para identificação de espécies mais frequentes da família <i>Streptococcaceae</i> causadoras da mastite bovina.....	41
Tabela 2 - Características principais dos gêneros das bactérias Gram negativas mais frequentemente isoladas de mastite bovina.....	42
Tabela 3 - Características bioquímicas para identificação das espécies de <i>Corynebacterium</i> spp.....	45
Tabela 4 - Composição média do leite de vacas da raça holandesa.....	58
Tabela 5 - Mudanças nos constituintes do leite com elevada CCS.....	59
Tabela 6 - Alterações na composição do leite (g/100g) associadas à mastite subclínica.	59
Tabela 7 - Estimativa da redução na produção de leite por vaca, associada com a média de CCS durante a lactação.	61
Tabela 8 - Isolados bacterianos nas duas etapas de coleta: amostras compostas e por quartos mamários bovinos.	81
Tabela 9 - Isolados de <i>Corynebacterium</i> spp. identificados por sequenciamento de genes 16S rRNA versus MALDI/TOF-MS.....	82
Tabela 10 - Isolados Não- <i>Corynebacterium</i> spp. identificados por sequenciamento de genes 16S rRNA versus MALDI/TOF-MS.....	83
Tabela 11 - Frequência de identificação bacteriana por MALDI/TOF-MS em amostras de leite de quartos mamários	85
Tabela 12 - Frequência de distribuição de <i>Corynebacterium</i> spp. identificados por MALDI/TOF-MS.....	86
Tabela 13 - Efeito da infecção intramamária causada por <i>Corynebacterium</i> spp. sobre a composição e a CCS no leite em nível de quartos mamários não-contralaterais de uma ordenha.....	102
Tabela 14 - Produção, composição do leite e CCS, por espécies de <i>Corynebacterium</i> identificadas pelo sequenciamento de genes 16S rRNA.....	104
Tabela 15 - Distribuição de quartos mamários anteriores e posteriores, infectados por <i>Corynebacterium bovis</i> e sadios, em relação às médias das variáveis CCS, produção de leite e PLC.....	105
Tabela 16 - Efeito da IIM causada por <i>Corynebacterium</i> spp. sobre composição, produção e CCS no leite de quartos mamários contralaterais.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMP	Christie, Atkins e Munch-Peterson
CAS	Caseína
CCS	Contagem de células somáticas
CE	Condutividade elétrica
CMT	Califórnia mastites test
CNS	Coagulase negative <i>Staphylococcus</i>
CPS	Coagulase positive <i>Staphylococcus</i>
CS	Células somáticas
CSF	Fator de estimulação de colônias
D	Densidade
EMBL/EBI	European Molecular Biology Laboratory
EPM	Erro padrão de media
ES	Extrato seco
ESD	Extrato seco desengordurado
G	Gordura
GLC	Cromatografia líquida-gasosa
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulinas
IIM	Infeção intramamária
ISO; IDF	International Organization for Standardization & Dairy Federation, International /Standard
KOH	Hidróxido de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
m/z	Relação massa/carga
MALDI/TOF-MS	Espectrometria de massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
MPO	Mieloperóxidos
MS	Espectrometria de massas
NAGase	Acetyl- β -D-glucosaminidase
NCBI	National center for biotechnology information
NET	Armadilhas extracelulares
NMC	National mastitis council
NNC	Nitrogênio não-caseinoso
O/F	Oxidação/fermentação
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polymerase
PLC	Produção de leite corrigida
PMN	Neutrófilos polimorfunucleares
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SCN	Estafilococos coagulase negative
SeqGEN	Sequenciamento de genes 16S rRNA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TNF- α	Fator tumoral de necrose
TSA	Ágar tríptico de soja
TSB	Caldo de tripcase soja
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Definições sobre mastite bovina	27
2.1.1	Mastite clínica e subclínica.....	32
2.1.2	Principais micro-organismos causadores da mastite	34
2.2	Prevalência de mastite bovina	36
2.3	Principais métodos de diagnóstico da mastite	37
2.3.1	Análises microbiológicas.....	37
2.3.1.1	<i>Cultura do leite de quartos mamários</i>	<i>33</i>
2.3.2	Identificação das espécies de <i>Corynebacterium</i> por meio da cultura do leite	44
2.3.3	Novas metodologias de identificação de isolados bacterianos causadores de mastite bovina	45
2.3.3.1	<i>Identificação por painéis comerciais</i>	<i>41</i>
2.3.3.2	<i>Sequenciamento de genes 16Sr RNA</i>	<i>42</i>
2.3.3.3	<i>Espectrometria de massas MALDI/TOF-MS</i>	<i>43</i>
2.3.4	A detecção da mastite por meio dos componentes do leite	50
2.3.5	A detecção da mastite por meio da contagem de células somáticas (CCS).....	51
2.4	<i>Corynebacterium</i> spp. como causador da mastite bovina.....	54
2.4.1	Sinais clínicos da mastite por <i>Corynebacterium</i> spp.	56
2.4.2	Controle e tratamento da mastite por <i>Corynebacterium</i> spp.	56
2.5	Composição e produção do leite	57
2.5.1	Efeito da CCS sobre a composição do leite	58
2.5.2	Efeito da CCS sobre a produção de leite	60
2.5.3	Efeito da CCS sobre a Gordura	61
2.5.4	Efeito da CCS sobre a Proteína	64
2.5.5	Efeito da CCS sobre a Lactose	67
2.5.6	Efeito da CCS sobre os demais componentes do leite.....	69
3	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Corynebacterium</i> spp. ISOLADOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI/TOF).....	71
	RESUMO	71
	ABSTRACT	71
3.1	Introdução	72
3.2	Materiais e métodos.....	73

3.3	Resultados	80
3.4	Discussão	87
3.5	Conclusão	92
4	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE EM VACAS COM MASTITE CAUSADA POR Corynebacterium spp	93
	RESUMO	93
	ABSTRACT.....	94
4.1	Introdução.....	94
4.2	Materiais e métodos	97
4.3	Resultados	100
4.4	Discussão	107
4.5	Conclusão	112
5	CONCLUSÕES.....	113
	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

A mastite é a enfermidade mais onerosa da produção leiteira bovina (HALASA, 2007), cuja causa mais comum são infecções subclínicas do tecido glandular causadas por bactérias (DJABRI et al., 2002; PHILPOTT; NICKERSON, 2002). A intensidade da resposta imune na glândula mamária frente à infecção depende do agente causador (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003) e do grau em que este coloniza a glândula (COSTA; BENITES; MELVILLE, 1995). Logo, informações acerca da prevalência de patógenos causadores e dos custos da mastite são de interesse da cadeia agroindustrial leiteira (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997). Tais custos estão associados às perdas de produção de leite, principalmente causados pela mastite subclínica (ANDERSEN et al., 2010), que acometem aproximadamente 50% dos animais (PITKÄLÄ et al., 2004).

A importância da mastite subclínica se deve a deterioração da qualidade de leite, aumento da CCS e redução de produção, sem apresentação de sinais clínicos (FORSBÄCK et al., 2009). As perdas ocorrem por danos causados pelos micro-organismos aos epitélios secretores de leite da glândula e ao enfraquecimento das junções celulares (AUDIST et al., 1995) e além disso, estes danos podem resultar na perda permanente da capacidade de síntese. Por outro lado, a indústria laticinista requer o aumento da produção de leite de qualidade para que se alcance maior rendimento de produtos derivados lácteos (FORSBÄCK et al., 2010b).

Considerando que os agentes principais da mastite têm sido mais bem controlados em decorrência de programas específicos de controle e prevenção, os agentes secundários têm chamado atenção e se tornado objeto de estudos nos principais países produtores de leite (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). *Corynebacterium* spp. são considerados agentes secundários da mastite e normalmente causam infecções subclínicas com aumento moderado na contagem de células somáticas (CCS) (BRADLEY; GREEN, 2005; SCHUKKEN et al., 2009). A alta prevalência destes agentes em rebanhos leiteiros tem despertado o interesse em práticas de controle e tratamento, principalmente em rebanhos de CCS moderada.

Os resultados do efeito de IIM causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a saúde da glândula mamária são ainda inconclusivos. Existem evidências de que *C. bovis* ao infectar quartos mamários apresentem função de barreira biológica contra patógenos primários da mastite (*S. aureus* e *Streptococcus* spp.) por meio de colonização do canal e cisterna do teto (RAINARD; POUTREL, 1982; SORDILLO et al. 1989; SCHUKKEN et al., 2003). Outros resultados sugerem que quartos com IIM causada por *C. bovis* são mais predispostos à

infecção causada por estreptococos ambientais, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Entretanto, existe tendência de considerar *Corynebacterium* spp. como de menor relevância por desencadear resposta inflamatória de baixa intensidade (LEVAN; BERHART; ESLER, 1985). *Corynebacterium bovis* foi relatado como causa importante da mastite bovina e com redução na produção de leite (METTIFOGO et al., 1991; GRÖHN et al., 2004; VICTÓRIA et al., 2005). Por outro lado, estes micro-organismos apresentam impacto limitado na produção e qualidade do leite (LEVAN; BERHART; ESLER, 1985; SCHUKKEN et al., 2009).

Poucos estudos determinaram a relação entre o agente causador da infecção subclínica e os seus efeitos sobre a produção e a composição do leite (LEITNER et al., 2006). Assim, avaliar o efeito de IIM causadas por *Corynebacterium* spp. pode ajudar a entender a relação entre este patógeno e os seus efeitos sobre as variáveis de produção, composição, e CCS. Entretanto, para avaliação destes efeitos é necessário metodologia de ordenha que minimizem fontes de variação, como por exemplo, o momento da amostragem durante a ordenha que pode influenciar a concentração de gordura. LeVAN, Berhart e Esler (1985) descreveram a possibilidade de utilizar quartos sadios (controle) em comparação a quartos infectados por *Corynebacterium* spp. para avaliação dos teores de gordura e proteína. No entanto, esta técnica pode ser mais bem empregada com o uso de equipamento para coleta de todo o leite produzido por quartos mamários separadamente (FORSBÄCK et al., 2010a, b). A importância de se coletar todo o leite para realização de análises composicionais foi relatada por Urech, Puhan e Schällibaum (1999) ao testar diferentes métodos de amostragem.

A maioria dos estudos avaliou o efeito de IIM por *Corynebacterium* spp. em nível de grupo ou gênero, no entanto, poucos avaliaram o efeito do *Corynebacterium* spp. em nível de espécie sobre a produção e composição do leite. Isto é devido a inexistência de métodos simples para identificação das espécies de *Corynebacterium* spp., e também, aos altos percentuais de erros de identificação destas espécies (30%) pela metodologia convencional (COYLE; LIPSKY, 1990; WATTS et al., 2000). No entanto, a MALDI/TOF-MS é uma técnica inovadora, de rápido diagnóstico e sensível para identificação de bactérias que já foi avaliada para a identificação de micro-organismos causadores da mastite, com exceção as espécies de *Corynebacterium* spp. (BARREIRO et al., 2010; THEEL et al., 2012).

Desta forma, as hipóteses deste estudo são: a) a IIM subclínica causada por *Corynebacterium* spp. em vacas leiteiras altera negativamente a composição, a produção e a CCS do leite; e b) as espécies do gênero *Corynebacterium* spp. isoladas de quartos mamários de vacas com mastite subclínica podem ser identificadas pela técnica de MALDI/TOF-MS.

Portanto, os objetivos gerais do presente estudo foram: 1) avaliar o efeito de IIMs subclínicas causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários bovinos; 2) determinar o efeito de IIM causadas por *Corynebacterium* spp. sobre o teor de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total, extrato seco desengordurado do leite e CCS; 3) avaliar a técnica de MALDI/TOF-MS para a identificação das espécies de *Corynebacterium* isoladas de quartos mamários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definições sobre mastite bovina

A IIM tem sido definida por diferentes terminologias que nem sempre são consistentes (ANDERSEN et al., 2010). Particularmente, as definições de IIM e mastite subclínica são quase sempre indistintamente utilizadas (BARKEMA et al., 1997). A IIM implica na presença de um micro-organismo infeccioso (BERRY; MEANY, 2006), e esta definição é muitas vezes argumentada com o requisito de aumento da CCS. A mastite subclínica indica inflamação, porém não necessariamente infecção do úbere (IDF, 1987; 2011), entretanto mastite subclínica é na maioria das vezes causada por infecção bacteriana (DJABRI et al., 2002) e isto poderia explicar o uso frequente do termo mastite subclínica quando referido a IIM.

Andersen et al., (2010) relataram por meio de revisão de literatura a existência de diferentes definições de IIM. Estas definições diferiram de acordo com o número de amostras utilizadas para determinar a condição de IIM; algum parâmetro de mensuração que indicasse a presença de inflamação, geralmente a mensuração da CCS com adoção de ponto de corte para quartos sadios; o número de micro-organismos cultivados; bem como, o número de colônias dos micro-organismos cultivados.

Muitos trabalhos têm utilizado apenas o leite de quartos mamários de uma ordenha para o diagnóstico de IIM. Por outro lado, existem relatos de determinação da condição de IIM por amostragem em duplicata ou triplicata (HILLERTON; COOPER; MORELLI, 2007). A utilização da CCS é baseada em ponto de corte (quartos sadios vs. infectados) que varia entre 100 a 300×10^3 células/mL (SCHUKKEN et al., 2003). Amostras são determinadas como contaminadas se 3 ou mais micro-organismos apresentarem crescimento em meio de cultura (PARKER et al., 2008). Quanto ao número de colônias dos micro-organismos cultivados, existem relatos da determinação da condição de infecção por *Streptococcus uberis* baseada em leite de apenas uma ordenha com requisito de contagem mínima de 1.000 cfu/mL (SORDILLO, 2012).

A importância de se realizar o diagnóstico da IIM baseada em amostras com isolamento de apenas um microrganismo, com mais do que dez colônias, com a necessidade de duas confirmações consecutivas do micro-organismo de amostras coletadas semanalmente foi relatado por Dohoo et al. (2011a). A interpretação de resultados baseada em amostras em

duplicata ou consecutivas resulta em alta sensibilidade da metodologia de identificação, porém em menor especificidade. Entretanto, amostras em triplicata fornecem a melhor combinação de sensibilidade e especificidade, porém comparado a amostras individuais, fornecem apenas modesto aumento na especificidade e pouco ou nenhum aumento na sensibilidade (DOHOO et al., 2011b).

Portanto, a IIM pode ser definida pela presença de um micro-organismo, com isolamento puro do microrganismo causador da infecção e com contagem de colônias superiores a 10 (cfu/mL). Além disso, a mensuração indireta pela CCS deve ser um indicativo de infecção quando superior a 200×10^3 células/mL. O método de amostragem, ou seja, como será coletado, conservado, armazenado, bem como o intervalo de tempo e o número de amostragem, precisa ser selecionado com base nos objetivos do estudo ou das investigações clínicas (DOHOO et al., 2011b).

É certa a necessidade de uma série de testes e critérios que levam a confirmação da IIM para que se possam adotar medidas de controle e tratamento. Entretanto, anteriormente ao processo infeccioso, o sistema de defesa do animal detecta a presença do micro-organismo com objetivo de prevenir a infecção. O conhecimento mais aprofundado deste sistema é importante do ponto de vista de prevenção. Por exemplo, o músculo do esfíncter do teto confere proteção por estar diretamente relacionado com o fechamento do canal do teto. No entanto, se a pressão do sistema de coleta for inadequada, poderá levar a hiperqueratose e consequentemente mastite subclínica com agrave a níveis de cronicidade, devido à quebra da barreira inicial de proteção.

A anatomia, a defesa celular e os fatores solúveis são alguns dos elementos de defesa da glândula mamária contra patógenos causadores da mastite (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). O mecanismo de defesa do tecido mamário pode ser separado em duas categorias, imunidade inata e específica. O sistema inato é a primeira linha de defesa contra micro-organismos invasores, enquanto que o sistema imune específico age como uma segunda linha de defesa e também protege contra nova exposição ao mesmo patógeno. Cada uma dessas subdivisões principais do sistema imune tem tanto componentes celulares como humorais, através dos quais executam funções de proteção. Além disso, o sistema imune inato também tem aspectos anatômicos que funcionam como barreiras à infecção. Embora esses dois ramos do sistema imune tenham funções distintas, há interconexão entre eles (isto é, componentes do sistema imune inato influenciam o sistema imune adaptativo e vice-versa) (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997).

Embora ambos os sistemas imunes inato e específico funcionem na proteção de micro-organismos invasores, eles diferem de várias maneiras. O sistema imune específico requer algum tempo para reagir contra um micro-organismo invasor, enquanto que o sistema imune inato inclui sistemas de defesa que, em sua maior parte, estão constitutivamente presentes e prontos para serem mobilizados em uma infecção. Além disso, o sistema imune específico é específico para um antígeno e reage somente contra o micro-organismo que induz a resposta. Em contraposição, o sistema imune inato não é específico para um antígeno e reage da mesma maneira para uma variedade de micro-organismos. Finalmente, o sistema específico possui memória imunológica. Ele “lembra” que já encontrou um micro-organismo invasor e reage mais rapidamente à exposição subsequente do mesmo micro-organismo. Ao contrário, o sistema imune inato não possui memória imunológica (SORDILLO, 2012).

A extremidade do teto é considerada a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos. Nela estão contidos os músculos do esfíncter que mantêm entre as ordenhas o fechamento do canal do teto, os quais dificultam a penetração bacteriana (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Internamente, o canal do teto contém queratina, que é crucial para a manutenção da função de barreira da extremidade do teto. A estrutura de queratina permite a captura de bactérias invasoras, impedindo assim a sua migração para a cisterna da glândula. Dentro do revestimento de queratina, agentes anti-microbianos têm sido identificados, os quais ácidos graxos esterificados e não esterificados estão presentes, tais como o ácido mirístico, ácido palmitoléico e ácido linoléico que são bacteriostáticos (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997). Além disso, proteínas catiônicas no canal podem se ligar electrostaticamente aos patógenos da mastite, o que leva à alteração da parede da célula bacteriana, tornando-as mais susceptíveis à pressão osmótica. A incapacidade de manter a osmolaridade causa lise e a morte das bactérias invasoras (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Quando a barreira anatômica de defesa não consegue evitar a entrada do micro-organismo ao interior da glândula, patógenos bacterianos são capazes de atravessar a abertura da extremidade do teto e escapar das atividades antibacterianas do microambiente da glândula mamária, e assim o sistema de defesa celular com a finalidade de evitar o estabelecimento da doença é acionado (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Esta defesa acontece por meio de células de defesa que são chamadas de células somáticas, as quais consistem em vários tipos celulares, tais como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

Segundo Sordillo (2012), uma resposta inflamatória eficaz durante as fases iniciais da infecção consiste na eliminação rápida de patógenos infecciosos, sem quaisquer alterações visíveis aos tecidos do hospedeiro. Entretanto, resposta inflamatória agressiva pode causar

danos à glândula mamária do animal e contribuir significativamente para o fisiopatologia da doença.

Os receptores de células do tecido mamário expressam moléculas padrão que se tornam ativadas por fatores microbianos e liberam vários mediadores inflamatórios, tais como citocinas e eicosanóides que iniciam a cascata inflamatória. Estes mediadores inflamatórios agem diretamente sobre o endotélio vascular para provocar reduções na velocidade sanguínea com um aumento concomitante da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. As moléculas de adesão nos leucócitos se anexam as moléculas de adesão vascular para facilitar migração de leucócitos a partir do sangue para o local da lesão (HODGKINSON et al., 2007).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos constituem as células fagocíticas primárias, os quais são a primeira linha celular de defesa contra a invasão de micro-organismos (BOUTET et al., 2004). Os neutrófilos são o tipo de célula predominante a sofrer este processo de extravasamento durante as fases iniciais de inflamação. Os neutrófilos primeiro marginalizam, em seguida, aderem ao endotélio próximo ao local da infecção. Citocinas, eicosanóides e outras moléculas mediadoras estimulam os neutrófilos aderentes a mover-se entre as células endoteliais e a passarem pela membrana basal para as áreas de tecidos danificados. O movimento de neutrófilos no interior dos tecidos é facilitado por gradientes de quimiotaxia criados por moléculas mediadoras inflamatórias em sítios de infecção localizada. A migração dos neutrófilos pode ocorrer de forma rápida dentro dos tecidos afetados, ocorrendo em até 30 a 60 minutos após a lesão (SUMMERS et al., 2010). Tanto as populações recém-recrutadas e as pré-existentes de leucócitos agem cooperativamente para eliminar patógenos causadores da infecção (SORDILLO, 2012).

Na glândula mamária sadia, os macrófagos predominam e atuam como sentinelas para impedir os patógenos causadores de mastite (PAAPE et al., 2002). Os macrófagos localizados dentro dos tecidos respondem a invasão bacteriana pela liberação de citocinas imuno-reguladoras e eicosanóides. Ambos os macrófagos e os neutrófilos recentemente recrutados também fagocitam e matam os micro-organismos invasores. O processo de fagocitose envolve a internalização de bactérias dentro de fagossomas que contêm compostos bactericidas, por exemplo, o efeito de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os de enzimas hidrolíticas. O efeito de ROS é formado pela atividade de explosão respiratória que envolve a ativação da enzima NADPH oxidase e a posterior produção de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Os Mieloperóxidos (MPO) podem ainda combinar-se com cloreto de peróxido de

hidrogênio para produzir hipoclorito que está associado com atividades bacterianas (SORDILLO; AITKEN, 2009).

Além da fagocitose, neutrófilos podem matar as bactérias através de mecanismos extracelulares. Neutrófilos ativados podem formar armadilhas extracelulares (NET), que consistem de um tecido de fibras compostas de proteases, cromatina e serina. Estudos sugerem que as redes oferecem uma alta concentração de substâncias antibacterianas, que se ligam e matam as bactérias independentemente da absorção fagocitária na glândula mamária (GRINBERG et al., 2008; LIPPOLIS et al., 2006). O NET também pode servir como uma barreira física que impede ainda mais a propagação de bactérias ao longo da glândula mamária (SORDILLO, 2012).

Os fatores solúveis estão associados com as funções de defesa da glândula mamária em conjunto com as defesas celulares no leite e tecidos, onde cada sistema modifica as funções efetoras do outro (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997). Por exemplo, a atividade do sistema imune celular na fisiopatologia da mastite bovina é regulada por citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas funcionam como fatores solúveis que aumentam a capacidade bactericida de macrófagos e neutrófilos, os quais promovem o direcionamento de neutrófilos ao local da infecção, com seguinte indução da maturação de células dendríticas e o controle da resposta imune adquirida. Até o presente momento, algumas citocinas, como as interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), o fator de estimulação de colônias (CSF), interferon gamma (IFN- γ) e o fator tumoral de necrose (TNF- α) foram encontradas em glândulas mamárias sadias e infectadas (OVIEDO-BOYSSO et al., 2007).

Estes fatores solúveis podem ser divididos em componentes inatos e específicos. Por exemplo, a glândula mamária também contém fatores bacteriostáticos solúveis que atuam independentemente ou em associação com as imunoglobulinas (Ig). Estas proteínas são produzidas por linfócitos antígeno-B ativados que subsequentemente proliferam e se diferenciam em células plasmáticas secretoras de anticorpos. Os anticorpos em secreções lácteas são sintetizados localmente ou são seletivamente transportados do soro. Quatro classes de anticorpos (Ig) são conhecidas por influenciar a defesa da glândula mamária contra bactérias que causam a mastite: IgG1, IgG2, IgA e IgM (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997).

Uma vez que a bactéria adentra ao canal do teto é a eficiência do mecanismo de defesa que determina a resistência da glândula mamária à nova IIM (OVIEDO-BOYSSO et al., 2007).

Muitas vezes durante o ciclo de lactação quando a defesa da glândula mamária falha o animal torna-se mais susceptível aos patógenos causadores de mastite.

2.1.1 Mastite clínica e subclínica

A mastite continua a ser a doença mais importante economicamente do gado leiteiro, respondendo por 38% do total dos custos diretos das doenças que afetam a produção (KOSSAIBATI; ESSLEMONT, 1997). Esta enfermidade foi relacionada com uma perda econômica anual de aproximadamente US\$ 400 milhões por laticínios dos Estados Unidos (FETROW et al., 2000). Os custos econômicos associados à mastite incluem perda de produção de leite, custos com tratamento e potenciais danos em longo prazo ao tecido da glândula mamária. Os custos indiretos de mastite podem incluir penalidades por causa de aumento da CCS, aumento no descarte e taxas de reposição de animais, o que leva à perda de potencial genético (FETROW et al., 2000; BLOWEY; EDMONDOSON, 2010).

Nos últimos 40 anos, grande progresso tem sido feito com objetivo da redução de IIM (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010) principalmente com a implementação do programa de 5 pontos (HILLERTON et al, 1995; ZADOKS et al, 2002), e mais tarde estendido para o programa de 10 pontos (NMC, 2001), os quais consistem práticas de manejo eficazes para controle de todos os patógenos causadores de mastite (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). No Reino Unido, a incidência de mastite clínica decresceu de 121 casos (caso é um quarto afetado um vez) por 100 vacas em 1968, para 40 a 50 em 2009, após implementação dos programas de controle de patógenos causadores de mastite (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010). Nos últimos anos, tem sido observado declínio geral na incidência de mastite clínica. Por outro lado, os rebanhos canadenses apresentaram uma taxa de incidência de 23 casos a cada 100 vacas por ano. (OLDE-RIEKERINK et al., 2008). Green et al. (2002) relataram que 38% dos casos de mastite clínica (n=84) acontecem logo após o parto devido à IIM de lactações anteriores não resolvidas, e descreveram associação de alta prevalência da mastite clínica com a falha na secagem de quartos.

A média de custo por caso de mastite clínica foi estimada em £175 (KOSSAIBATI, 2000). Segundo Bradley (2002) a mastite clínica despende anualmente £168 milhões as indústrias laticinistas do Reino Unido. Somado a isto, a mastite clínica têm sido a causa mais

comum de morte em vacas leiteiras adultas. A taxa de mortalidade anual por esta forma de mastite foi de 0,6% em vacas em lactação (BRADLEY; GREEN, 2001).

A inflamação da glândula mamária pode se manifestar sob a forma clínica, a qual é marcada por respostas inflamatórias mais graves, que resultam em mudanças visíveis da secreção láctea ou do tecido mamário (HORTET; SEEGER, 1998). Segundo Leslie e Petersson-Wolfe (2012) a mastite clínica é caracterizada por sinais visíveis de dor e desconforto devido ao inchaço e rubor do úbere, aparência deprimida do animal, perda de peso e posturas anormais, além da perda funcional do tecido secretor de leite.

A mastite subclínica é a principal forma de mastite nas fazendas leiteiras modernas, a qual acomete entre 20-50% das vacas em lactação (PITKÄLÄ et al., 2004). Entretanto, uma avaliação de custos relacionados a um caso de mastite subclínica não parece ser fácil, e isto se deve ao efeito de diluição do leite produzido por quartos sadios sobre quartos afetados, o que torna imperceptível esta forma de mastite quando realizadas mensurações de qualidade do leite por amostras compostas ou de leite de tanque (FORSBÄCK et al., 2010a). Halasa et al. (2007) descreveu que os principais efeitos da mastite subclínica estão associados à queda de produção de leite e as mudanças nos componentes do leite.

Na forma subclínica não há mudanças visíveis nas características do leite ou do úbere, mas é a forma mais predominante de IIM e que apresenta maior importância epidemiológica por ser transmitida de forma imperceptível pelo rebanho (BRADLEY, 2002). Além disso, esta forma da doença pode tornar-se crônica, que é caracterizada por um período prolongado de infecção da glândula mamária. Curiosamente, a mastite crônica pode permanecer indefinidamente em uma fase subclínica, ou alternar entre as formas clínicas e subclínicas (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Ao passo que os agentes principais da mastite estão mais bem controlados em decorrência de programas específicos de controle e prevenção, agentes ambientais causadores de mastite clínica tem sido problema para as propriedades que utilizam sistemas intensivos de produção de leite (*free e tie stall*) (BRITTEN, 2012; LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012). Por outro lado, a incidência de mastite subclínica causada por agentes primários nas propriedades onde o sistema de produção de leite não é intensivo, tem apresentado decréscimo em relação a incidência de mastite subclínica causada por agentes secundários, o que têm chamado atenção e se tornado objetivo de estudo nos principais países produtores de leite (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Em resumo, infecções intramamárias, clínica ou subclínica, representam um grande problema para a cadeia agroindustrial do leite (LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012).

2.1.2 Principais micro-organismos causadores da mastite

Diferentes micro-organismos podem ser causadores de infecções na glândula mamária, como micoplasmas, fungos, leveduras, algas e, em raras ocasiões, vírus (BRADLEY, 2002). Mais de 137 diferentes tipos de micro-organismos podem causar mastite, sendo a causa mais comum à infecção do tecido glandular por bactérias (WATTS, 1988).

O termo patógeno principal é usado em relação a micro-organismos causadores de mastite, entretanto como observado na literatura não existe definição universal que esteja em acordo a respeito de classificação de patógeno primário ou secundário. Geralmente, uma combinação de alta prevalência, a natureza contagiosa e o potencial em causar infecções clínicas, bem como os custos provindos da infecção que determinam se os patógenos são considerados como primários na epidemiologia da mastite (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997).

Bradley e Green (2005) descreveram que os patógenos principais, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, são responsáveis pela redução de qualidade do leite por provocarem resposta imunológica de diferentes intensidades (danos ao tecido, aumento da permeabilidade vascular e altas CCS). Pesquisas recentes descreveram a associação de redução da qualidade do leite por IIM causadas por *Mycoplasma* spp. e *Prototheca* spp. (BRITTEN, 2012; KEEFE, 2012). Por outro lado, foram descritas espécies de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativa como os patógenos secundários, devido às moderadas CCS (BRADLEY; GREEN, 2005; SCHUKKEN et al., 2009).

Classicamente, os micro-organismos causadores de mastite podem ser divididos em dois grupos com base em sua origem: patógenos contagiosos ou ambientais. Os patógenos contagiosos são aqueles adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária, caracterizados pela alta incidência da forma subclínica da doença, persistentes (longa duração) ou com episódios clínicos intermitentes de baixa incidência (BRADLEY, 2002). Nestes casos, os agentes são transmitidos entre vacas ou entre quartos durante o processo de ordenha por contaminação do equipamento de ordenha, mãos do ordenhador, ou toalhas que são utilizadas em mais de uma vaca (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2007). A mastite contagiosa é tipicamente associada com diminuição na produção de leite e

aumento da CCS do tanque. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são exemplos de patógenos contagiosos frequentemente isolados (SCHUKKEN et al., 2012).

A principal fonte de patógenos ambientais é o ambiente em que a vaca vive, com maior prevalência das bactérias coliformes e algumas espécies de *Streptococcus* (SCHUKKEN et al., 2012). Os patógenos ambientais podem ser chamados de oportunistas por invadirem a glândula mamária sem conseguir se adaptar em seu interior, o que leva a imediata resposta inflamatória (BRADLEY, 2002). Por isso, esta forma de IIM está associada com infecção de curta duração que podem resultar em redução da produção de leite e até mesmo na morte do animal. A IIM de origem ambiental é muitas vezes originada no período seco e acontece independentemente da presença de outras vacas infectadas com o mesmo patógeno. Frequentemente, fazendas com baixas CCS do leite de tanque são acometidas pela ocorrência da mastite ambiental (SCHUKKEN et al., 2012).

Com a disponibilidade de técnicas mais precisas de diagnóstico, a distinção clássica entre micro-organismos causadores de mastite contagiosa e ambiental deixou de existir (SCHUKKEN et al., 2012). Atualmente considera-se que todas as espécies de bactérias podem estar associadas com um ou outro comportamento de transmissão contagiosa ou do meio ambiente (ZADOKS et al., 2011). Um exemplo é que algumas cepas de bactérias dentro de uma espécie se comportam com padrão de transmissão contagiosa enquanto que outras se comportam com padrão de transmissão ambiental (SCHUKKEN et al., 2012).

O comportamento contagioso ou ambiental é um diagnóstico que deve ser baseado em nível de rebanho e não na característica da espécie bacteriana (SCHUKKEN et al., 2012). Assim, o simples isolamento das espécies de bactérias identificadas na fazenda não é suficiente para o diagnóstico em nível de rebanho quanto aos padrões de transmissão da mastite.

Para o diagnóstico, em nível de rebanho quanto ao comportamento ambiental ou contagioso do patógeno causador da IIM, é necessário o acompanhamento de três fontes de informação: análise de dados da CCS e de mastite clínica, avaliação completa dos principais fatores de risco da mastite, e o perfil de IIM do rebanho com base em resultados de cultura e análise da tipagem da cepa de bactéria selecionadas a partir de IIM (SCHUKKEN et al., 2009).

2.2 Prevalência de mastite bovina

A prevalência permite compreender o quanto é comum, ou rara, uma determinada doença ou situação numa população. Logo informações sobre a prevalência das bactérias causadoras de mastite bovina interessam os pesquisadores na área em estudo, a indústria de laticínios; bem como produtores, que podem direcionar os animais com IIM de alta prevalência de algum micro-organismo reconhecidamente problema, por exemplo, para o tratamento, segregação ou abate (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997).

Estudo realizado na Pensilvânia e Nova York, Estados Unidos, relatou prevalência de 48,5% para amostras positivas de micro-organismos no leite das 105.083 vacas estudadas. Os patógenos mais prevalentes foram *Staphylococcus* spp., 11,3% (n=11.825); *Streptococcus agalactiae*, 10,1% (n=10.648); *Staphylococcus aureus*, 9,1% (n=9.531); outras espécies de *Streptococcus*, 7,3% (n=7.646); e *Corynebacterium bovis*, 7,2% (n=7.664). Outras espécies de *Corynebacterium* representaram 0,1% (n=66) do percentual total (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997). Dentre os patógenos secundários, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase positiva, foram os agentes mais frequentemente isolados de quartos mamários (n=35.828) de vacas (n=8.957), com total de 29.57% (n=10.596) e 14.04% (n=5.030), respectivamente. (BARKEMA et al., 1997).

Schukken et al. (2009) amostraram vacas (n=352.614) e relataram maior prevalência de patógenos secundários, a qual foi similar a descrita por Barkema et al. (1997). Estes pesquisadores descreveram a prevalência de micro-organismos causadores de mastite em novilhas e vacas. Os patógenos mais prevalentes foram *Staphylococcus* coagulase positiva, 61,1% (n=13.926) em novilhas e 38,4% (n=17.099) em vacas; e *Corynebacterium bovis*, 12,3% (n=2.803) em novilhas e 19,5% (n=8.696) em vacas; seguidos das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*. Alta prevalência de IIM por *Corynebacterium* spp. em vacas primíparas nos quatro primeiros meses de lactação foi descrita por Laffranchi et al. (2001).

Corynebacterium spp. foi o isolado mais prevalente em estudo que avaliou 4.662 amostras de quartos mamários de 1.180 vacas, no estado de São Paulo, Brasil. Dos animais avaliados, 1.824 amostras foram CMT (*California Mastitis Test*) positivas e 379 não apresentaram crescimento bacteriano. Das 1.445 amostras restantes, 11,24% foram

Corynebacterium spp., 9,20% *Staphylococcus* spp. e 5,34% *Streptococcus* spp (SOUTO et al., 2008). Estes resultados foram similares aos de Schepers et al. (1997) que descreveram maior prevalência para *Corynebacterium bovis* 41,13% (n=9.242) entre quartos mamários amostrados (n=22.467). Também foram relatados *Staphylococcus* coagulase positiva (10,88%); *Staphylococcus aureus* (2,15%), *Streptococcus uberis* (<1%) e *Streptococcus dysgalactiae* (<1%).

Uma pesquisa brasileira realizou exames microbiológicos (n=6.315) de amostras de leite bovino (BRITO et al., 1999a). Os patógenos mais prevalentes foram *Corynebacterium* spp. (55,2%), *Staphylococcus aureus* (19,2%), SCN (12,4%), *Streptococcus agalactiae* (6,9%), *Streptococcus* esculina positivos (4,0%), *Streptococcus* esculina negativos (2,1%), leveduras (0,1%) e *Pseudomonas* spp. (0,1%). Em 39% das amostras (n=2.463) não houve isolamento no exame microbiológico e 3,4% (n=216) estavam contaminadas. Bactérias do gênero *Corynebacterium* spp. foram isoladas de todos os rebanhos e em 24 deles, 21 a 40% dos quartos estavam infectados. Em cinco rebanhos, mais de 50% dos quartos estavam infectados.

2.3 Principais métodos de diagnóstico da mastite

Os principais métodos de diagnóstico da mastite são: análises microbiológicas, detecção na concentração dos componentes do leite e CCS.

2.3.1 Análises microbiológicas

Análises microbiológicas do leite são indispensáveis para a adoção de medidas específicas de controle e tratamento da IIM (BUENO et al., 2003). Assim, o isolamento do agente causador é o principal método direto de diagnóstico da mastite (KITCHEN, 1981). Dohoo et al. (2011a) relataram a importância de se realizar o diagnóstico da IIM baseado no isolamento de cultura pura com o crescimento superior ao número de dez colônias (cfu/mL). Somados a isso, os dados do isolamento bacteriano podem ser comparados aos de métodos indiretos, como a CCS e concentração dos componentes do leite. O número de amostragem de

leite necessária para confirmação do diagnóstico da IIM está diretamente relacionado ao micro-organismo causador da infecção. E isto se deve a existência de relatos de que os valores de sensibilidade e especificidade do isolamento bacteriano dependem do micro-organismo causador da infecção (DOHOO et al., 2011b).

2.3.1.1 *Cultura do leite de quartos mamários*

O principal objetivo do diagnóstico microbiológico da mastite é oferecer resultados rápidos e seguros, para que se possam identificar problemas do rebanho e tomar decisões a respeito de casos individuais (BRITTEN, 2012).

Os procedimentos para coleta por quarto mamário, de amostras assépticas, por meio de ordenha manual, devem seguir os seguintes passos: a) identificação dos tubos (estéreis), contendo: data, fazenda, vaca e quarto mamário; b) limpeza dos tetos com água em situação de excessiva sujidade, principalmente quando houver material orgânico; c) imersão dos quartos mamários em solução de iodo 0,5% (pré-dipping) por 20 segundos e secagem com papel toalha descartável; d) descarte dos três primeiros jatos; e) limpeza do orifício do teto com gaze umedecida em álcool iodado 70%. Os tetos mais distantes em referência a quem realiza a coleta de leite devem ser higienizados primeiro, para evitar contaminação durante o processo de limpeza e antissepsia. Após todos estes procedimentos, a coleta das amostras de leite pode ser realizada (NMC, 1999).

Amostras coletadas devem ser acondicionadas a 4°C e enviadas ao laboratório de referência em até 24 horas. Caso não seja possível enviá-las para o laboratório neste período, mantê-las congeladas por até 30 a 45 dias antes do exame (BRITO; BRITO, 1999). O congelamento diminui o número de *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* e inativa bactérias do gênero *Nocardia* spp., porém está associado com o aumento do número de amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase negativa. Por outro lado, não apresenta efeitos negativos às bactérias *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* (SCHUKKEN et al., 1990).

Quanto aos tipos de amostragens do leite é possível a realização de exames microbiológicos por quartos mamários, quartos com CMT positivo ou de altas CCS, casos clínicos, amostras ao acaso ou amostra representativa de rebanho, leite de tanque. As

amostragens por quarto mamário e leite de tanque são as mais comumente utilizadas. Apesar da amostragem por quarto apresentar custos elevados, o conhecimento do nível e do tipo das infecções pode justificar o investimento, diferente das amostras de tanque que fornecem informações limitadas a respeito das infecções do rebanho. Um exemplo é a baixa relação existente para agentes ambientais como coliformes ou *Pseudomonas* em amostras de tanque como causa de mastite. Assim, a presença destes agentes na amostra de tanque não significa necessariamente que eles sejam causa da mastite (BRITTEN, 2012).

Uma forma muito utilizada de minimizar tempo e custo se baseia na seleção de amostras CMT positivo para isolamento microbiológico. Nestes casos, o gasto com exames microbiológicos é reduzido, porém amostras de resultados negativos no CMT ou de baixa contagem de células somáticas podem ser amostras falso-negativas, uma vez que o animal pode estar infectado. Brito et al. (1999a) descreveram alto número de amostras com CMT negativo com isolamento positivo para algum patógeno causador da mastite. Foram relatados 34% de amostras CMT negativo com presença de *Staphylococcus aureus*, 52% *Staphylococcus* coagulase negativa, 19% *Streptococcus agalactiae* e 68% com isolamento de *Corynebacterium* spp. Portanto, a seleção de somente animais com escore positivo no CMT para cultura do leite não são totalmente adequados na identificação desses casos.

Para rotina de cultura, 10 µL de leite são plaqueados por meio de alça de platina em meio de cultivo ágar sangue adicionados de 5% de sangue bovino ou ovino (NMC, 1999). É possível a adição de 0,1% de esculina e beta-hemolisina de *Staphylococcus aureus* ao ágar sangue, os quais antecipam resultados de hidrólise de esculina e do teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson) (BRITO; BRITO, 1999). Em seguida, as placas são submetidas à incubação. O tempo de incubação e a temperatura variam de acordo com o micro-organismo ou grupo de micro-organismos (NMC, 1999). Em geral, as placas são incubadas a 37°C por 48 horas, com leitura das colônias após 24 e 48 horas, mas com o diagnóstico final realizado após 48 horas de incubação. A cada leitura é necessário examinar e interpretar as placas observando-se as características coloniais (nº de colônias, pigmentação, tamanho, presença de hemólise) e a presença de contaminantes.

Muitas vezes o padrão de liberação de bactérias da glândula mamária com mastite vai variar dependendo do tipo de bactéria e a fase de infecção. Isto se deve, ao maior número de unidades formadoras de colônias (cfu/mL) liberadas no leite em fases iniciais de infecção, do que nas fases seguintes ao decorrer da infecção (SCHALM; LASMANIS; CARROLL, 1964). Um exemplo é o que acontece com a IIM por *Staphylococcus aureus*, que apresenta alta liberação do patógeno em glândulas recentemente infectadas, porém com contagens

bacterianas muito baixas com o decorrer da infecção, o que pode levar a diagnósticos falso-positivos uma vez que são estriados em placa apenas 10µL de leite (BRITTEN, 2012). Assim, uma forma de se evitar falso-positivos devido à baixa concentração de bactérias no leite seria a utilização de repetições de amostras (DOHOO et al., 2010b). Sears et al. (1990) descreveram que a sensibilidade de identificação aumenta de 75% quando utilizado apenas uma amostra de leite, para 94% e 98% quando realizada identificação em duplicata e triplicata, respectivamente. Outra possibilidade de aumentar a sensibilidade de identificação, quando realizado apenas uma coleta de amostra, é o uso da inoculação de 100µl com pipetador em meio de placa, ao invés de uma alçada (10 µl) em um quarto de placa (BRITTEN, 2012). Para alguns patógenos, por exemplo para *Prototheca* spp., a sensibilidade de detecção da infecção pode ser baixa, necessitando meios de cultura específicos com inoculação entre 100 a 200 µl de leite em placa individual (BRITTEN, 2012).

Após isolamento inicial, o exame de esfregaços corados pelo método de Gram para verificar a morfologia e a coloração do organismo isolado é o primeiro passo para separar os grupos de micro-organismos. O teste do KOH 3% (hidróxido de potássio) também pode ser utilizado para diferenciação entre Gram positiva ou negativa. Posteriormente, os cocos são diferenciados pelo teste da catalase: positivo para o gênero *Staphylococcus* e negativo para *Streptococcus* (NMC, 1999).

As espécies de *Staphylococcus* spp. estão entre os micro-organismos mais frequentemente isolados de amostras de leite assepticamente coletadas. *Staphylococcus* spp. são diferenciados pela prova coagulase em CNS (coagulase negative *Staphylococcus*) ou CPS (coagulase positive *Staphylococcus*). Dentre os CPS, outras provas (aglutinação em lâmina e acetoina) podem ser realizadas no intuito de diferenciação de *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*. As cepas restantes de *Staphylococcus* coagulase positiva não-*S. aureus* podem ser diferenciadas pelo teste da beta-glucoronidade, entre *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* (NMC, 1999).

Para *Staphylococcus* coagulase negativa, a identificação espécie-específica é mais difícil de ser realizada rotineiramente. Estes micro-organismos são considerados habitantes normais da pele de animais, e apresentam certa importância à mastite em vacas de primeira lactação e vacas em fase inicial de lactação (SCHUKKEN et al., 2009). Infecções por estes micro-organismos são tipicamente subclínicas e aproximadamente 10% das infecções por CNS estão associadas com baixas CCS, abaixo de 500×10^3 céls/mL. As cepas de CNS isoladas com maior frequência de mastite são: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri*,

S. haemolyticus, *S. hominis*, *S. xilosus*, *S. lentus* e *S. sciuri* (SCHUKKEN et al., 2009). A identificação das cepas de CNS pode ser realizada genotipicamente pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) (SANTOS et al., 2008).

A família *Streptococcaceae* é dividida em três gêneros, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus*, os quais estão incluídos patógenos importantes à mastite bovina. Contudo, entre estes gêneros as espécies mais isoladas do leite mastítico são *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, e *S. uberis* (*S. equinus*). Entretanto, outras espécies de *Streptococcus* podem ser isoladas, como *S. acidominimus*, *S. alactolyticus*, *S. canis*, *S. equi*, *S. bovis*, e *S. parauberis*. Entre as espécies de *Enterococcus* possíveis de isolamento, no entanto com menor frequência, destacam-se *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. saccharolyticus* (NMC, 1999). Do ponto de vista do diagnóstico e controle, é extremamente importante diferenciar *S. agalactiae* dos demais *Streptococcus*, porque este pode ser erradicado dos rebanhos, enquanto as outras espécies não podem, e não respondem às mesmas medidas de prevenção e controle (BRITTEN, 2012).

Uma vez realizado confirmação de cocos Gram positivos e com prova catalase negativa, podem ser realizados alguns testes bioquímicos para identificação das espécies pertencentes à família *Streptococcaceae* (Tabela 1).

Tabela 1 - Testes para identificação de espécies mais frequentes da família *Streptococcaceae* causadoras da mastite bovina.

Espécies	CAMP	Esculina	Hipurato de Sódio	Cresc. em 6,5% de NaCl	Cresc. a 45°C	Cresc. em meio de bile-esculina	Grupo de Lancefield
<i>S. agalactiae</i>	+	-	+	D	-	-	B
<i>S. dysgalactiae</i>	-	d	-	-	-	-	C
<i>S. uberis</i>	d ¹	+	+	-	-	-	m ²
<i>S. bovis</i>	-	+	-	-	+	+	d
<i>Enterococcus</i> spp.	-	+	d	+	+	+	d

¹d: reação variável: 10 a 89% de amostras positivas. ²: m: sorologicamente heterogêneo. Fonte: BRITO; BRITO, 1999b.

Das bactérias Gram negativas as mais comumente isoladas em amostras de leite pertencem ao grupo coliforme e aos gêneros *Serratia* spp. e *Pseudomonas* spp. Dentre os coliformes, os principais gêneros causadores de mastite incluem: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (BRITTEN, 2012).

Patógenos Gram negativos estão diretamente relacionados com a mastite ambiental, visto o alto percentual dos mesmos no ambiente onde os animais vivem, como por exemplo, a cama. Uma alta proporção de novas infecções causadas por este tipo de bactérias ocorre

durante as duas semanas depois da secagem do animal ou duas semanas após o parto. Aproximadamente 40% das mastites clínicas são causadas por bactérias Gram negativas, porém isto comumente acontece nos Estados Unidos onde a maioria das fazendas leiteiras trabalham com sistemas intensivos, como o *free* ou *tie-stall*. Além disso, muitos casos clínicos causados por patógenos Gram negativos resultaram em mudanças quase imperceptíveis no leite, e inchaço leve para severo nos quartos mamários afetados. Embora alto percentual de bactérias Gram negativas desencadeie casos clínicos, 10% de infecção pode ocorrer em vacas em lactação, com evolução para casos de mastites mais graves (NMC, 1999).

Diferentes testes bioquímicos são necessários para identificação das bactérias Gram negativas frequentemente isoladas da mastite bovina (Tabela 2). O isolamento em meio ágar MacConkey é muito útil para identificação prévia destas bactérias, e isto se deve a possibilidade de diferenciar as bactérias fermentadoras da lactose (ex.: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) das não-fermentadoras (*Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp.). O teste de oxidase e de oxidação/fermentação da glicose (O/F) é útil para separar organismos do gênero *Pseudomonas*, que são oxidase positivos e possuem metabolismo oxidativo da glicose (BRITO; BRITO, 1999).

Tabela 2 - Características principais dos gêneros das bactérias Gram negativas mais frequentemente isoladas de mastite bovina.

Características	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Mobilidade	V ¹	-	+	+	+	+
Indol	+	V	-	V	+	-
Vermelho de metila (VM)	+	-	-	+	+	-
Voges-Proskauer (VP)	-	+	+	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	V	-
Urease	-	-	-	-	+	-
Descarboxilação Ornitina	V	-	+	V	-	-
Descarboxilação Lisina*	V	+	+	-	-	-

¹V: reação variável. Fonte: BRITO; BRITO, 1999b.

Os bastonetes Gram positivos têm sido isolados com alta frequência de leite bovino no Brasil, principalmente *Corynebacterium* spp. (BRITO et al., 1999a; SOUTO et al., 2010). Os bastonetes mais comumente isolados são os diferóides ou corineformes. Dentre os principais,

Corynebacterium spp., especialmente *C. bovis*; *Arcanobacterium* spp., e *Arcanobacterium pyogenes*; *Nocardia* spp., e *Bacillus* spp., principalmente *Bacillus cereus*.

Arcanobacterium pyogenes é o único micro-organismo dentre os demais bastonetes Gram positivos que apresenta catalase negativa e hemólise total após 48 horas de incubação a 37°C em meio ágar sangue. Infecções causadas por *A. pyogenes* resultam em mastite severa, aguda, com secreção anormal e odor característico (NMC, 1999).

Nocardia spp., *Arcanobacterium* spp., *Bacillus cereus* e *Corynebacterium* spp. apresentam prova de catalase positiva. Portanto, as características observadas no momento da leitura das placas com 48 horas ou com tempo maior de incubação são cruciais para diferenciação destes patógenos para que se evitem erros no diagnóstico. *Nocardia* spp. forma bastonetes filamentosos delgados, com ramificações e formas cocóides. Entretanto, a característica colonial em placa (48-72 h) é a principal característica diferenciadora destes patógenos dentre os demais bastonetes. Este micro-organismo possui colônias de crescimento aprofundado ao ágar e de difícil remoção. *Bacillus cereus* apresenta colônias grandes, ligeiramente cinza com bordas irregulares, e são frequentemente rodeadas por uma zona clara de hemólise. Na microscopia, estes bastonetes apresentam-se como formadores de esporos que tendem a formar cadeias. Estes micro-organismos ainda podem apresentar prova Gram de resultado variável (NMC, 1999).

Muitos laboratórios de diagnóstico da mastite bovina tem adotado como rotina a identificação dos *Corynebacterium* spp. apenas no sentido de diferenciação dentre os demais bastonetes de caráter mais patogênico como a *Nocardia* spp. (HARMON et al., 1990; HOGAN et al., 1999).

Quanto aos *Arcanobacterium* spp., existe tendência de se identificar apenas a espécie *A. pyogenes*, e todo o restante de amostras de bastonetes que não apresentem-se como *Nocardia* spp. e *Bacillus* spp. são chamadas de *Corynebacterium* spp. Isto se deve as características pleomórficas que os *Corynebacterium* apresentam, e que torna improvável o diagnóstico em nível de microscopia óptica (NMC, 1999).

Outros patógenos causadores de mastite bovina são raramente encontrados por serem infrequentes, porém já foram descritos como causas de infecção severa. Sendo assim, pode-se suspeitar da presença de fungos, leveduras, algas (*Prototheca* spp.) e *Mycoplasma* quando ocorre mastite grave e que não responde ao tratamento usual. Estes micro-organismos exigem alguns procedimentos diferentes dos usuais, como meios de cultura sob tempo e temperaturas de incubação diferentes, e outras técnicas de coloração de lâminas para microscopia óptica (BRITTEN, 2012).

2.3.2 Identificação das espécies de *Corynebacterium* por meio da cultura do leite

As espécies de *Corynebacterium* spp. pertencem aos actinomicetos que são caracterizados por parede celular com ácido meso-diaminopimélico, arabinose, galactose e de cadeia curta de ácidos micólicos, que estão incluídos em muitos micro-organismos patogênicos a humanos e animais (COYLE; HOLLIS; GROMAN, 1985).

Os actinomicetos estão distribuídos em seis gêneros organizados em 3 famílias: *Mycobacteriaceae* (contendo o gênero *Mycobacterium* spp.), *Corynebacteriaceae* (contendo o gênero *Corynebacterium* spp.) e *Nocardiaceae* (contendo quatro gêneros, o gênero *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Gordona* spp. e *Tsukamurella* spp.).

A identificação de *Corynebacterium* spp. isolados da glândula mamária de bovinos pode ser feita pela morfologia das colônias cremosas, de coloração branco ou cinza, opacas, secas, pequenas variável para beta-hemólise sobre o ágar sangue. Insuficiente ou sem crescimento visível após 24 horas de incubação a 37°C, porém com crescimento evidente após 48 horas de incubação a 37°C. Quando uma alçada de leite é usada para estriamento em placa, as colônias crescem agrupadas na porção onde tem maior concentração de gordura. Quando swab é utilizado para o estriamento, as colônias se difundem por toda a placa (NMC, 1999).

Corynebacterium spp. é um gênero de bactérias aeróbias não encapsuladas, de bastonetes com prova Gram positiva e catalase positiva. Este gênero pode ser classificado quanto à exigência lipídica que algumas espécies necessitam para auxiliar em seu crescimento. Assim, espécies que necessitam de ácidos graxos livres como suplemento para melhor crescimento são chamadas de *Corynebacterium* lipofílicas, e as demais espécies que não necessitam de adição de gordura são chamadas de não-lipofílicas. *C. bovis* é a espécie lipofílica mais frequentemente isolada dentre as espécies de *Corynebacterium* spp. encontradas no leite bovino (PANKEY et al., 1985; WOODWARD et al., 1987; WATTS, 1988; HOMMEZ et al., 1999).

Não existem laboratórios que prestam diagnóstico da mastite bovina para identificação das espécies de *Corynebacterium* spp., provavelmente devido à laboriosa rotina de grande quantidade de testes, e às vezes com resultados inconclusivos. Além disso, existe em torno de 30% de erro na identificação de *Corynebacterium* spp. pelo método da microbiologia padrão (COYLE; LIPSKY, 1990; WATTS et al., 2000).

De acordo com Homme et al. (1999), *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Corynebacterium minutissimum* foram as espécies não-lipofílicas mais isoladas do leite bovino. Estes autores propuseram uma chave de identificação após terem testado 33 testes microbiológicos.

Segundo National Mastitis Council (2004), *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Corynebacterium minutissimum* são as 5 espécies de *Corynebacterium* mais prevalentes de mastite bovina. Alguns testes bioquímicos podem ser realizados para identificação destas espécies, porém estes apenas descartam possibilidades de ser ou não uma espécie, sem que se possa realizar um diagnóstico conclusivo (Tabela 3). Atualmente, segundo a lista de nomes procarióticos de J.P. Euzéby, existem 111 espécies citadas e 11 subespécies no gênero *Corynebacterium* spp., Estas quantidades nos indica a possibilidade de cepas ainda não estudadas como possíveis causas da mastite subclínica e clínica bovina.

Tabela 3 - Características bioquímicas para identificação das espécies de *Corynebacterium* spp.

Características	<i>C. bovis</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>C. ulcerans</i>
Beta-hemólise	-	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Redução de nitrato	-	V	-	V	-
Urease	-	V	-	+	+
Oxidação/fermentação	O	F	F	F	F
Hidrólise da esculina	-	-	-	-	-
Lipofilismo	+	-	-	-	-
Beta-galactosidase	+	-	-	-	-
CAMP teste	-	-	-	Reverso	Reverso-

V: variável. O: oxidação. F: fermentação. Reverso: *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* podem produzir uma área em forma de “V” desprovida de hemólise adjacente à faixa de estriamento de *Staphylococcus aureus*. Fonte: NMC, 2004.

2.3.3 Novas metodologias de identificação de isolados bacterianos causadores de mastite bovina

Vários métodos têm sido utilizados na identificação de espécies de *Corynebacterium* spp. Estes métodos incluem painéis comerciais (ex. API *Coryne* system, Biolog system);

cromatografia líquido-gasosa (GLC); PCR seguida de restrição enzimática ou sequenciamento de genes 16SrRNA e/ou *rpoB*. As técnicas mais modernas utilizadas na identificação de patógenos causadores de IIM, e que podem ser extrapoladas à identificação das espécies de *Corynebacterium* spp. estão descritas a seguir.

2.3.3.1 Identificação por painéis comerciais

O conceito de combinar uma série de meios ou substratos diferenciais em uma única embalagem, selecionados para ajudar na identificação de membros de um grupo de bactérias, consiste um avanço biotecnológico. Os micro-organismos que atualmente são reconhecidos como agentes etiológicos de doenças infecciosas não são apenas numerosos, mas também exigem uma grande bateria de testes bioquímicos para sua identificação (FRENEY et al., 1991). A manutenção da diversidade de meios convencionais necessários está além da capacidade de muitos laboratórios. O modelo compacto (exigindo pouco espaço de armazenamento), as reações químicas facilmente visíveis, o longo prazo de validade e o controle de qualidade padronizado oferecido pelos fabricantes desses *kits* fazem com que sejam muito convenientes para o uso nos laboratórios de microbiologia (FUNKE; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998). São particularmente úteis em laboratórios com pouco volume de trabalho, onde pode não haver tempo nem experiência técnica necessária para efetuar muitas dessas identificações, e onde é mais difícil manter o controle da qualidade (WIN et al., 2010).

Dentre os painéis comerciais para identificação de espécies de micro-organismos, alguns apresentam fatores limitantes para identificação de espécies de *Corynebacterium* relacionadas à mastite (WATTS et al., 2000). Esses painéis apresentam melhor desempenho para as espécies que crescem aerobicamente, além de possuírem pequeno número de substratos, e não requererem nenhum tipo de suplementação nutricional para micro-organismos mais exigentes, principalmente para os que necessitam de período de incubação de 24 a 72 h. Reações de espécies lipofílicas (*Corynebacterium bovis*) podem ser inconsistentes quando as reações de substratos em painéis comerciais são lidas dentro do prazo normal estipulado para a incubação.

Ao utilizar o sistema RapID CB plus system (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Ga.), 80,9% de espécies de *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. foram

identificadas. Bactérias foram identificadas em nível de gênero (12,2%), 3,7% foram identificadas erroneamente, e 3,2% não foram identificadas (FUNKE; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998).

Resultados da identificação por meio de metodologia convencional foram comparados aos identificados pelo sistema de identificação API *Coryne* (API-bioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France). O painel comercial API *Coryne* apresentou 97,6% de concordância com a metodologia convencional, entretanto foram utilizadas somente cepas isoladas de amostras clínicas humanas. Apenas 1,2% dos casos foram identificados erroneamente, e 1,2% não foram identificados por não ter apresentado nenhum código de identificação que constava no banco de dados (FRENEY et al., 1991).

Painéis comerciais, Biolog system (Biolog, Inc., Hayward, CA) e API *Coryne* (API-bioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France) foram avaliados quanto a identificação das espécies de *Corynebacterium* spp. isoladas do leite bovino e comparados ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Os painéis apresentaram equivalência entre as técnicas avaliadas de 54% e 88%, respectivamente. Ambos os sistemas tiveram dificuldades de identificação de outras espécies de *Corynebacterium* spp. O sistema Biolog identificou maior número de *C. jeikeium* ao invés de *C. bovis*, porém apresentou-se eficaz a identificação de *C. amycolatum*. Embora o API *Coryne* tenha apresentado percentual maior de identificação para *C. bovis*, este painel não conseguiu identificar demais espécies de *Corynebacterium* spp., como *C. amycolatum* identificado pelo sequenciamento. Nenhum destes painéis apresentou-se eficaz a identificação de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* ou *C. xerosis* (WATTS et al., 2000).

Vila et al. (2012) utilizaram cepas de *Corynebacterium* spp. de origem humana para comparar três metodologias de identificação (sistema API *Coryne*, sequenciamento de genes 16S rRNA e a MALDI/TOF-MS) e descreveram a relação de 89% de equivalência de resultados entre a MALDI/TOF-MS e o sistema API *Coryne*.

2.3.3.2 Sequenciamento de genes 16S rRNA

O sequenciamento do DNA para análise de um produto amplificado é atualmente um método comum de análise pós-amplificação. Esta tecnologia exige muitas vezes que o usuário tenha experiência no alinhamento de sequências, na edição de programas de computador e no uso de bancos de dados genéticos (WIN et al., 2010). O sequenciamento é particularmente útil

ao se analisar um grupo de micro-organismos para se determinarem as áreas de conservação e de variabilidade no amplicon obtido por PCR de largo alcance. A análise dessas regiões variáveis se torna então instrumento potente para a identificação dos micro-organismos (KOLBERT; PERSING, 1999).

Amostras clínicas humanas (n=683) isoladas fenotipicamente como bastonetes Gram positivas foram comparadas a metodologia de sequenciamento de genes 16S rRNA. Para 83,1% dos isolados (n=568), a sequência de identificação forneceu o nível de identificação por espécie. Para 15,8% das amostras (n=108), a identificação foi limitada ao nível de gênero, e para 1% dos isolados (n=7), não foi possível a identificação. Para os isolados identificados apenas ao nível de gênero, o sequenciamento de genes 16S rRNA não conseguiu identificar bactérias ao nível taxonômico por 3 motivos: a) falta de diferenciação entre as espécies em 66% dos isolados (n=72); b) falta de qualquer sequência intimamente relacionada no banco de dados de 13,8% dos isolados (n=15); e c) presença de mais de 1% de posição indeterminada na sequência de 12% das amostras (n=13) (MIGNARD; FLANDROIS, 2006).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma metodologia eficaz de identificação das espécies de *Corynebacterium* spp. isoladas do leite bovino (WATTS et al., 2000). Segundo Huxley, Helps e Bradley (2004), o sequenciamento e a análise filogenética do gene 16S rRNA são reconhecidas como técnicas de referência para a diferenciação de espécies estreitamente relacionadas. É particularmente útil para espécies de *Corynebacterium* spp. porque pelo sequenciamento do gene 16S rRNA as taxas de divergência da sequência são relativamente elevadas (PASCUAL et al., 1995). No entanto, o sequenciamento genético ainda é relativamente caro e não está dentro da realidade de muitos laboratórios, o que o torna uma técnica limitada em estudos de grande escala (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004).

O sequenciamento de genes (16S rRNA) de todas as espécies atualmente reconhecidas de *Corynebacterium* spp. estão publicadas e disponíveis para análise no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI/GenBank, e também, disponíveis no banco de dados do *European Molecular Biology Laboratory* – EMBL/EBI.

2.3.3.3 Espectrometria de massas (MALDI/TOF-MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em

misturas complexas, por meio da determinação de suas massas moleculares na forma iônica baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass to charge ratio*) (SOUZA, 2008).

Um espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores (Figura 2). A ionização é o processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de m/z . Para a ionização por MALDI, a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização, e que quando seca, cristaliza-se juntamente com o analito. A transferência de energia por MALDI ocorre por meio da irradiação pulsada de laser. A matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito. Uma vez ionizados, os íons são levados para dentro do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo. Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (RUELLE et al., 2004)

Analisadores de tempo de voo são baseados no princípio de que os íons com a mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Portanto, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são aceleradas através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes (BARREIRO, 2011). Assim, o íon de menor massa (menor valor de m/z) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (HOFFMANN; STROOTBART, 2007).

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens. Utilizando esse método, bactérias podem ser identificadas comparando seu espectro de massas (obtido em poucos segundos), com espectros referência de cepas por meio de análise estatística multivariada.

A MALDI/TOF-MS é uma técnica moderna de identificação de micro-organismos causadores de mastite de grande aplicabilidade (BARREIRO, et al., 2010). Esta tecnologia tornar o diagnóstico de isolados mais rápido, preciso e espécie-específico. A técnica de MALDI/TOF-MS é bastante difundida principalmente em proteômica, devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas, e

ainda por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (SIUZDAK, 2006). A análise de proteínas biomarcadoras, únicas e representativas para cada micro-organismo, constitui a base das aplicações atuais da espectrometria de massas para caracterização de bactérias. As análises de micro-organismo através do estudo de *fingerprints* de massas tem a vantagem de ser extremamente estável e totalmente independente de fatores como meio de cultivo, temperatura e suprimento de oxigênio durante o cultivo do micro-organismo (WELKER, 2011).

Cepas não fermentadoras (n=248) de gêneros relevantes de infecções humanas (n=37) foram selecionadas de uma bacterioteca para construção de um banco de dados referência para identificação por MALDI/TOF-MS, de acordo com as recomendações do fabricante Biotyper MALDI software (Bruker Daltonik, Leipzig, Alemanha). Em seguida, cepas de rotina clínica (n=80) foram identificadas pela MALDI/TOF-MS por meio do banco de dados criado, as quais foram comparadas aos resultados de identificação por meio do sequenciamento de genes 16S rRNA. Pelo sequenciamento de genes 16S rRNA, apenas 57 dos 80 isolados (71,25%) foram identificados em nível de espécie. Entretanto, a MALDI/TOF-MS identificou 67 dos 78 isolados (85,9%) (MELLMANN et al., 2008). Outras pesquisas têm apresentado a MALDI/TOF-MS como uma ferramenta útil na identificação de patógenos causadores de infecções clínicas (CARBONNELLE et al., 2007; DUBOIS et al., 2010). Espécies de *Corynebacterium* spp. isoladas de amostras clínicas podem ser identificadas com altos percentuais de similaridade quando comparados a outras técnicas (KONRAD et al., 2010; ALATOOM et al., 2012; THEEL et al., 2012; VILA et al., 2012). No entanto, a técnica MALDI/TOF-MS ainda não foi avaliada para caracterização de diferentes espécies de *Corynebacterium* spp. oriundos do leite bovino mastítico.

2.3.4 A detecção da mastite por meio dos componentes do leite

Quando não há necessidade de identificação do agente causador, a detecção de alteração na concentração dos componentes do leite também pode ser utilizada como forma de diagnóstico indireto à mastite (KITCHEN, 1981). Os principais mecanismos pelos quais ocorre alteração nos níveis dos componentes do leite são a lesão às células epiteliais produtoras de leite (AULDIST et al., 1995), que pode resultar em alteração da concentração

de lactose, proteína e gordura; e o aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como o sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas. Forsbäck et al., (2009) descreveram que vacas afetadas pela mastite apresentam menores valores de lactose, α_{s1} e β -caseína e potássio; enquanto apresentam aumento no teor de proteínas do soro, sódio, α -lactoalbumina, LDH e lactoferrina, os quais por meio de mensuração possibilitam o diagnóstico de IIM.

Uma abordagem mais detalhada sobre os componentes do leite está descrito no item 2.5.

2.3.5 A detecção da mastite por meio da contagem de células somáticas (CCS)

Quando um micro-organismo invade a glândula mamária, esta reage com o recrutamento de células de defesa (leucócitos) para o local, com o objetivo de reverter o processo infeccioso. Essas células de defesa somadas as células de descamação do epitélio secretor de leite dos alvéolos são chamadas de células somáticas do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

As células somáticas incluem 75% leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eritrócitos) e 25% de células epiteliais (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). Macrófagos são predominantes no leite de vacas saudáveis e constituem entre 30 e 74% do total da população celular no leite de quartos saudáveis (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997; PAAPE et al., 2002). As células epiteliais são resultado da descamação normal e da renovação do epitélio secretor da glândula mamária, no entanto, durante a infecção ocorre maior descamação com consequente aumento da contagem deste tipo celular (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). Os glóbulos brancos funcionam como mecanismo de defesa para combater a infecção e ajudar na reparação de tecidos danificados. Durante a inflamação, aumento da CCS é devido ao influxo de neutrófilos provindos do sangue para o leite para combater a infecção, e estes foram estimados em maior de 90% (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997).

Normalmente, o leite oriundo de glândulas mamárias saudáveis apresentam CCS abaixo de 200×10^3 células/mL (DOHOO; LESLIE, 1991; SCHUKKEN et al., 2003; BRADLEY; GREEN, 2005). Este valor de corte (200×10^3 células/mL) está diretamente relacionado à especificidade e a sensibilidade do teste, devido os resultados serem valores numéricos

contínuos. Em outras palavras, Bradley e Green et al. (2005) descreveram que em torno de 75% das vacas com IIM apresentam $CCS > 200 \times 10^3$ células/mL (sensibilidade) e 75% das vacas sem IIM apresentaram $CCS \leq 200 \times 10^3$ células/mL (especificidade), o que explica a adoção de 200×10^3 células/mL como ponto de corte.

Vários fatores podem influenciar a CCS: a) o tipo de micro-organismo e a gravidade de infecção causada pelo mesmo a glândula; b) os estágios de lactação; c) a idade e a raça do animal; d) o parto, as estações do ano e o nível de estresse; e) a variação entre ordenhas; f) a conservação e a forma de amostragem (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011).

O grau e a natureza da resposta celular são provavelmente proporcionais à gravidade da infecção, a qual depende do agente causador da mastite (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003). A CCS aumenta após o parto, indiferente se a vaca está infectada ou não (DOHOO; MEEK, 1982). Vacas no momento do parto apresentam CCS acima de 1.000×10^3 células/mL, entretanto apresentam decréscimo para 100×10^3 células/mL em 7 a 10 dias pós-parto. A CCS é diretamente proporcional ao aumento da idade, e isto se deve ao aumento da prevalência de infecção nas vacas mais velhas (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). Menores CCS foram descritas durante o inverno em relação às CCS avaliadas no verão. Durante o verão, o crescimento e o número de bactérias ambientais está aumentado em materiais como a cama (KHATE; YADAV, 2010). Forsbäck et al. (2010b) descreveram que a CCS é menor nas ordenhas da manhã devido a um efeito de diluição. Logo, ordenhas do período da tarde apresentam maiores CCS. A forma de amostragem pode influenciar a CCS, sendo necessária 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).

O monitoramento do processo inflamatório da glândula mamária pode ser feito baseado no uso de diferentes ferramentas de diagnóstico: California Mastitis Tests (CMT), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), condutividade elétrica (CE) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) (SCHUKKEN et al., 2003).

A contagem de células somáticas é o método diagnóstico mais utilizado para detecção da mastite. Este método é considerado o mais moderno e preciso para avaliação da saúde da glândula de quartos mamários, independente da amostragem ser individual ou por rebanho. A CCS do leite de tanque, por exemplo, permite estimar a porcentagem de quartos mamários infectados pelos micro-organismos causadores de mastite (RYSANEK; BABAK; ZOUHAROVA, 2007). É uma ferramenta utilizada por ter uma estreita relação com a

prevalência de mastite do rebanho (RYSANEK; BABAK, 2005). Todavia, o úbere da vaca é uma glândula secretora composta por quatro quartos funcionalmente separados (SANTOS; FONSECA, 2007). Logo, cada quarto mamário possui um aparelho glandular secretor que pode sofrer efeito de IIM individualmente. Neste contexto, o monitoramento da CCS no leite oriundo de cada quarto descreve a saúde do úbere de forma mais apropriada (SCHUKKEN et al., 2003).

A determinação da CCS pode ser feita através de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos para contagem de células somáticas no leite envolvem o uso de microscopia óptica, raramente utilizado nos dias de hoje devido ao surgimento dos contadores eletrônicos. Diferente, o CMT é um método indireto de mensuração de células somáticas, popular e prático que pode ser utilizado na propriedade no momento da ordenha sem demandar grandes custos. Este teste é baseado numa reação com detergente aniônico neutro que atua no rompimento da membrana das células presentes na amostra de leite, liberando o material nucléico (DNA), o qual possui alta viscosidade. Desta forma, o resultado do teste é avaliado em função do grau de viscosidade (SANTOS; FONSECA, 2007). Entretanto, a metodologia atualmente empregada se baseia na contagem eletrônica de células a partir da detecção da fluorescência emitida pela reação de um corante com o DNA das células somáticas, como por exemplo, o que acontece na metodologia por citometria de fluxo (International Organization for Standardization & Dairy Federation, International Standard – ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:2006). Sharma, Singh e Bhadwa (2011) relataram que os dois dispositivos comumente mais utilizados são: o Culter Milk Cell Counter e o Fossomatic.

O método eletrônico de CCS apresenta uma série de vantagens em relação ao CMT. Em primeiro lugar, o procedimento eletrônico para a CCS por ser automatizado, possibilita maior rapidez, precisão dos resultados e análise de grande número de amostras. Outra vantagem é a possibilidade de conservar as amostras em temperatura ambiente e enviá-las pelo correio para análise laboratorial. Por outro lado, quando a CCS do leite é feita com o uso de microscopia, pode ser realizada a contagem diferencial dos leucócitos, enquanto a contagem eletrônica apresenta como resultado apenas o número total de células, expresso em células por mililitro (SANTOS; FONSECA, 2007).

Algumas enzimas encontradas no leite são também usadas como marcadores de mastite, a exemplo da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGse) e mais recentemente da lactato desidrogenase (LDH). A NAGse é uma enzima intracelular que é liberada dos leucócitos polimorfonucleares durante a fagocitose e lise celular. A LDH é uma enzima citoplasmática e faz parte da via glicolítica (FORSBÄCK, 2010c). Urech, Puhon e Schällibaum (1999)

descreveram que a mensuração da NAGase é melhor do que a CCS, quando se pretende avaliar presença de enzimas proteolíticas.

2.4 *Corynebacterium* spp. como causador da mastite bovina

Corynebacterium bovis é a espécie mais isolada de IIM de bovinos. Porém, seu papel como agente causador de mastite é controverso. *Corynebacterium bovis* foi encontrado associado apenas à camada de queratina do canal do teto sem evidência microscópica de danos ao epitélio do canal. Os resultados sugerem que *C. bovis* não infecta epitélios acima da roseta de Furstenberg (BLACK; MARSHALL; BOURLAND, 1972). *C. bovis* foram avaliados quanto à habilidade de aderência das células epiteliais do canal do teto. A adesão às células epiteliais não ocorreu em todas as amostras avaliadas, e nas que ocorreram, não foram tão intensas quanto à adesão pelos outros micro-organismos *S. agalactiae* e *S. aureus* (FROST, 1975).

O crescimento de *C. bovis* nas secreções mamárias foi avaliado durante período fisiológico de transição da glândula mamária bovina. Em geral, a glândula mamária inibe o crescimento de *C. bovis* durante o período seco, com exceção as cepas de *C. bovis* resistentes à estreptomicina que apresentaram crescimento nas secreções mamárias durante o processo de involução da glândula. Por outro lado, foi relatado persistência de *C. bovis* em infecções intramamárias durante processo de lactação (OLIVER; JUNEJA, 1989).

Meio de cultura contido de metabólitos de *C. bovis* foi avaliado para o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. A curva de crescimento de *S. agalactiae* foi similar a de culturas mista de *C. bovis* e *S. agalactiae*. Entretanto, o crescimento de *S. aureus* foi inibido durante as fases logarítmicas e estacionárias no leite que continham culturas mistas de *C. bovis* e *S. aureus* (HOGAN; PANKEY; DUTHE; 1986).

Corynebacterium bovis causam IIM de baixa intensidade por estarem mais frequentemente associados à camada de queratina do teto, e devido a esta localização de adesão exercer proteção contra invasões de patógenos causadores de mastite (BROOKS; BARNUN, 1984). Existem evidências de que quartos infectados com *C. bovis* apresentam barreira biológica contra patógenos primários da mastite (*S. aureus* e *Streptococcus* spp.) por meio de colonização do canal e cisterna do teto (RAINARD; POUTREL, 1982; SORDILLO et al. 1989; HUXLEY; GREEN; BRADLEY, 2003). Pankey et al. (1985) avaliaram quartos

mamários quanto à infecção por *C. bovis* na susceptibilidade de patógenos principais da mastite bovina. Quartos com infecções por *Corynebacterium bovis* foram mais resistentes à infecção por *Staphylococcus aureus* em relação a quartos bacteriologicamente negativos. Quartos mamários infectados com *C. bovis* foram significativamente menos infectados com outros micro-organismos patogênicos do que quartos sem isolamento bacteriano (BROOKS; BARNUN, 1984; LAM et al, 1997).

Estudos posteriores contrariaram o efeito protetor em quartos com IIM por *C. bovis* (HOGAN et al, 1988). Quartos mamários foram avaliados quanto à infecção causada por *C. bovis* na susceptibilidade de patógenos principais da mastite bovina. Quartos infectados com *Corynebacterium bovis* foram aproximadamente 8,5 vezes mais suscetíveis à infecção por *Streptococcus agalactiae* que quartos bacteriologicamente negativos (PANKEY et al., 1985). A infecciosidade a glândula mamária de camundongos foram avaliadas quanto ao efeito de mastite causada por *C. bovis*, subsequentemente a mesma glândula foi submetida à infecção por *Staphylococcus aureus*. Não houve prevenção de *Staphylococcus aureus* pela infecção prévia por *C. bovis*, e nem qualquer influência significativa sobre a contagem bacteriana (HONKANEN-BUZALSKI; ANDERSON; BRAMLEY, 1985). Resultados sugerem que quartos com IIM causada por *C. bovis* são mais predispostos à infecção causada por estreptococos ambientais, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Entretanto, existe uma tendência de considerá-los micro-organismos de menor relevância por provocar resposta inflamatória de baixa intensidade (BRAMLEY, 1975; BROOKS; BARNUN, 1984; LEVAN; BERHART; ESLER, 1985; SORDILLO et al., 1989; POCIECHA, 1989; BRADLEY, GREEN; 2005).

A presença de *Corynebacterium* spp. em regiões mais profundas do tecido mamário foi relatada por Benites, Melville e Costa (2003), o que indica potencial invasivo destes micro-organismos ao tecido mamário bovino. Alteração nos epitélios cisterna do teto, roseta de Furstenberg, e no parênquima mamário devido à infecção por *C. bovis* foram observadas em 16 dos 19 quartos em que foram realizados exames histopatológicos (NGATIA; JENSEN, 1991). Entretanto, recente pesquisa avaliou por meio de cânula intramamária o grau de colonização do *C. bovis* ao tecido mamário. Os resultados indicaram o potencial deste micro-organismo em colonizar o canal do teto sem causar infecção intramamária verdadeira (BROOKS; BARNUM, 1984; BEXIGA et al., 2011).

2.4.1 Sinais clínicos da mastite por *Corynebacterium* spp.

Corynebacterium spp. é considerado um patógeno secundário que infecta principalmente vacas durante a lactação, sem causar sinais clínicos e com aumentos moderados na CCS (BRADLEY; GREEN; 2005). Em geral, a doença é caracterizada por sintomas leves e de pouca alteração na constituição físico-química do leite (HUXLEY; GREEN; BRADLEY, 2003).

Corynebacterium spp. já foi isolado em casos de mastite clínica e como responsável por alterações significativas em nível celular (COSTA et al. 1985; SCHUKKEN et al. 1989b; BOYER, 1998; HOGEVEEN, 1998). A ocorrência sob a forma de surto e a capacidade de provocar mastite clínica persistente demonstra sua patogenicidade e o colocam como agente causador da mastite com caráter contagioso (COSTA et al. 1985). Por outro lado, alta proporção de amostras de leite de animais clinicamente normais é positiva para *C. bovis*, e, portanto, similar proporção de amostras oriundas de mastite clínica também podem apresentar-se positivas ao *C. bovis*. Isolados acidentais de *C. bovis* podem ter sido julgados como causa de mastite clínica (HUXLEY; GREEN; BRADLEY, 2003).

2.4.2 Controle e tratamento da mastite por *Corynebacterium* spp.

C. bovis prontamente coloniza o canal do teto de vacas leiteiras e tem sido usado como um indicador de higiene no momento da ordenha (WATTS et al., 2000). Em fazendas onde a desinfecção dos tetos pós-ordenha não é prática de rotina, *C. bovis* foi isolado em mais que 60% dos quartos amostrados (WOODWARD et al., 1987). Brito, et al, (1999a) em estudo sobre o padrão de IIM sugeriram que as medidas de controle para as mastites contagiosas não foram corretamente aplicadas nos rebanhos estudados onde se observou alta prevalência de *Corynebacterium* spp. Os produtos cujo ingrediente ativo é o LDBSA (ácido sulfônico linear duodecilbenzeno) não apresentaram resultados satisfatórios na desinfecção dos tetos contra *Corynebacterium* spp. (NMC, 1999). Por outro lado, produtos a base de iodo e clorexidina são eficazes para desinfecção dos tetos pós-ordenha (TIMM et al. 2000). Em termos de controle para eliminação de infecções subclínicas causadas por *C. bovis*, além da desinfecção dos tetos

após a ordenha, a terapia da vaca seca tem a mesma importância. Durante a lactação não se recomenda o tratamento dos casos subclínicos causados por *Corynebacterium* spp.

2.5 Composição e produção do leite

O objetivo principal da produção de leite é promover alto nível nutricional à prole nos primeiros dias ou semanas de vida. Entretanto, com a domesticação de vacas leiteiras, houve uma extensão do tempo de produção, com o objetivo de alcançar maior produção de leite para o suprimento da alimentação humana e fabricação de derivados lácteos. Hoje, uma proporção significativa de alimentos consumido em todo o mundo tem sua origem do leite de vacas (KELLY, 2010).

O leite é sintetizado nas células que revestem os alvéolos, os quais são sacos pequenos ao final dos dutos profundos dentro do úbere (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). O leite é uma solução diluída de sais, de açúcar simples e vitaminas, no qual a gordura está emulsificada em glóbulos, e contém um complexo sistema de proteínas, muitas das quais na forma de agregados coloidais (micelas de caseínas), menores do que os glóbulos de gordura (KELLY, 2010).

A água é o componente mais abundante do leite no qual se encontram em solução os demais compostos. Alguns minerais apresentam-se na forma de solução iônica, a lactose e a albumina aparecem como solução verdadeira, a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura na forma de pequenos glóbulos dispersos, constituindo uma emulsão (WALSTRA; JENNES, 2002).

A composição e a produção do leite apresentam uma natureza dinâmica que varia com o estágio e número de lactações; frequência de ordenhas diárias; alimentação, balanço energético e estado nutricional; estado de saúde dos animais, eventuais enfermidades do úbere e a idade dos animais; diferenças devidas as estações do ano (variações sazonais), temperatura ambiental; fatores genéticos e características raciais (FOX; MCSWEENEY, 1998).

No Brasil há quatro principais raças leiteiras, Holandesa e Pardo-suíça (nas regiões sul e sudeste), Jersey (Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul) e Gir, além das mestiças, como a Girolanda (3/8Gir e 5/8Holandês) mais produtivas que as vacas Gir e mais rústica que as Holandeses (AUAD; SANTOS; CARNEIRO, 2010). Entretanto, a maior

parte da produção de leite brasileira é oriunda da utilização de mestiços zebuínos, com destaque para os resultantes do cruzamento Holandês x Gir, como a raça Girolanda (FACÓ et al., 2002). A composição média do leite de vacas da raça holandesa pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição média do leite de vacas da raça holandesa.

Componentes	Quantidade (%)
Água	87,5
Sólidos totais	12,5
Lactose	4,8
Gordura	3,6
Proteína	3,3
Caseína	2,9
Imunoglobulinas	1,0
Cinzas	0,7
Cálcio	0,12
Fósforo	0,09
Vitamina E (µg/g gordura)	20
Vitamina D (µg/g gordura)	15
Vitamina A (µg/g gordura)	8

FONTE: Adaptado de Blowey; Edmondson, 2010.

2.5.1 Efeito da CCS sobre a composição do leite

A mastite subclínica altera negativamente a composição do leite (HARMON, 1994; SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). A mastite determina mudanças nas concentrações tanto dos principais componentes do leite (proteína, gordura e lactose), quanto de outros componentes (minerais e enzimas). Os principais mecanismos pelos quais ocorre alteração nos níveis dos componentes do leite são as lesões às células epiteliais produtoras de leite (AULDIST et al., 1995). Durante a mastite a permeabilidade da barreira sangue-leite aumenta, permitindo que as células de defesa passem do sangue para o leite. Este aumento de permeabilidade também resulta na passagem de outros componentes entre a barreira sangue-leite ou vice-versa (ALLEN, 1990; BARBANO; RASMUSSEN; LYNCH, 1991). Somado a isto, as células epiteliais podem ser destruídas devido às toxinas bacterianas, e por isso a capacidade secretória é comprometida. O aumento da permeabilidade e a redução da síntese de leite resultam no decréscimo da produção de leite e alteração na composição do mesmo (FORSBÄCK et al., 2010c). A qualidade do leite está diretamente relacionada à CCS (Tabela

5) (SCHALLIBAUM, 2001). Existe uma correlação negativa significativa entre a CCS e o conteúdo de matéria seca do leite; quando a CCS está elevada, pode haver uma redução de 5 a 10% da matéria seca do leite. Na Tabela 6 são apresentados exemplos de alterações nos componentes do leite causados pela mastite. A concentração das proteínas totais permanece relativamente estável, mas o teor de caseína decresce, enquanto os de albumina e imunoglobulina aumentam. Há aumento de cloretos, sódio e do pH, que tende para a alcalinidade (NMC, 1999; SCHALLIBAUM, 2001).

Evidentemente, as alterações na composição do leite em função da mastite vão depender do tipo do patógeno causador da IIM, do grau de infecção e do estágio da doença (LEITNER et al., 2006). Mudanças mais acentuadas podem ser visíveis nos casos de mastite clínica, quando comparadas com os casos subclínicos (WILSON et al., 2004). Além da mastite causar a diminuição dos principais constituintes do leite, outra grande consequência é a alta concentração de enzimas proteolíticas liberadas pelas células de defesa, as quais alteram o sabor e o tempo de prateleira dos derivados lácteos (SANTOS; MA; BARBANO, 2003).

Tabela 5 - Mudanças nos constituintes do leite com elevada CCS.

Constituintes do leite	CCS (x10 ³ cell/ml)				Razão da mudança
	<100	<250	500-1000	>1000	
<i>Diminuição (g/100mL)</i>					
Lactose	4.9	4.74	4.60	4.21	Redução da síntese
Caseína	2.81	2.79	2.65	2.25	
Gordura	3.74	3.69	3.51	3.13	
<i>Aumento (g/100mL)</i>					
Proteínas do soro	0.81	0.82	1.10	1.31	Dispersão do sangue
Albumina	0.02	0.15	0.23	0.35	
Imunoglobulinas	0.12	0.14	0.26	0.51	
Cloro	0.091	0.096	0.121	0.147	
Sódio	0.057	0.062	0.091	0.105	
Potásio	0.173	0.180	0.135	0.157	
Ph	6.6	6.6	6.8	6.9	

FONTE: Adaptado de Schallibaum, M. National Mastitis Council, Inc. 40th Annual Meeting Proceedings. 2001.

Tabela 6 - Alterações na composição do leite (g/100g) associadas à mastite subclínica.

Componentes	Leite normal	Leite com altas CCS
ESD*	8,90	8,80
Gordura	3,50	3,20
Lactose	4,90	4,40
Proteína total	3,61	3,56
Caseína total	2,80	2,30
Proteínas do soro	0,80	1,30
Soro-albumina	0,02	0,07

Lactoferrina	0,02	0,10
Imunoglobulinas	0,10	0,60
Sódio	0,06	0,11
Cloreto	0,009	0,15
Potássio	0,17	0,16
Cálcio	0,12	0,04

FONTE: Adaptado de *National Mastitis Council* (1999). *ESD: Extrato seco desengordurado.

2.5.2 Efeito da CCS sobre a produção de leite

Um dos maiores sintomas da mastite é a redução da produção de leite (HARMON, 1994; URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999; FORSBÄCK et al., 2009; FORSBÄCK et al., 2010a, b). A elevação da CCS no leite em um quarto mamário afetado está geralmente associada à diminuição na produção de leite naquele quarto (FORSBÄCK et al., 2009). Esta redução na produção de leite ocorre devido ao dano físico nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, assim como alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor (KITCHEN et al., 1981; BARBANO; RASMUSSEN; LYNCH, 1991). A redução da produção de leite em nível de quarto mamário pode variar entre 3 a 50% do potencial de produção, dependendo da severidade da inflamação (FORSBÄCK et al., 2010c). Independentemente do estado bacteriológico da vaca, a produção de leite pode diminuir com o aumento da CCS (MILLER et al., 1983). Existe uma forte relação entre queda da produção e o aumento da CCS, com maior redução observada quanto maior for a CCS (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Estimativas sobre perdas de produção relacionadas com a mastite podem ser feitas considerando-se a CCS do leite. De modo geral, para vacas com mais de duas lactações, à medida que a CCS duplica, há uma perda aproximada de 0,6 kg de leite por dia, ou de cerca de 180 kg por lactação (Tabela 7). A redução na CCS em 50% (400×10^3 para 200×10^3 células/mL) aumentou a produção de leite em uma quantidade estimada de 180 kg por vaca em lactação (NMC et al., 1999).

Outro estudo observou relação entre a baixa CCS de quartos mamários e maior produção de leite. A produção de leite por quarto mamário começou a declinar já em quartos onde a CCS foi $>100 \times 10^3$ células/mL (FOX et al., 1985). Tolle et al. (1971) observaram uma redução na produção de leite em amostras com CCS acima de 50×10^3 células/mL. Têm-se questionado se as consequências da inflamação, incluindo a CCS elevada, conduz a uma baixa produção de leite ou se alta produção de leite leva a uma baixa CCS. Resultados indicam que existe um efeito de diluição da produção de leite na CCS (FORSBÄCK et al., 2009, 2010a, b,

c). O alto impacto da CCS nas perdas de produção de leite deve ser considerado (GREEN et al., 2006).

Philpott (1984) descreveu 2,5% de decréscimo na produção de leite a cada aumento de 100×10^3 células/mL de CCS. Outros pesquisadores relataram aumento da produção de leite, quando a CCS apresentou-se abaixo de 90×10^3 células/mL (DELUYKER; GAY; WEAVER, 1993).

Tabela 7 - Estimativa da redução na produção de leite por vaca, associada com a média de CCS durante a lactação.

CCS ($\times 10^3$ células/mL)	Redução na produção de leite (kg/305 dias)	
	Lactação 1	Lactação 2
12,5	-	-
25	-	-
50	-	-
100	90	180
200	180	360
400	270	540
800	360	720
1.600	450	900

FONTE: Adaptado National Mastitis Council, 1999.

2.5.3 Efeito da CCS sobre a Gordura

A gordura do leite é formada nas células secretoras do úbere, este componente é constituído principalmente pelos triglicerídeos (mais do que 95% da gordura do leite) (BLOWEY; EDMONDSON, 2010), os quais são formados por três ácidos graxos ligados a éster com uma molécula de glicerol (KELLY, 2010). O componente do leite mais variável é a gordura (WALSTRA; JENNES, 2002; BLOWEY; EDMONDSON, 2010) geralmente com percentual que pode variar de 3 a 5% (KELLY, 2010).

Pequenas partículas de gordura de leite (triglicerídeos) são extrudadas pelas células secretoras dos alvéolos e são cobertas, antes de passar para o leite, por uma fina membrana de proteína originada da membrana do plasma apical das células epiteliais (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). A gordura do leite existe primeiramente como glóbulos de gorduras, com um tamanho que pode variar de 0,1 a 15 μm (WALSTRA; JENNES, 2002).

Mais do que 440 diferentes tipos de ácidos graxos já foram identificados no leite (WALSTRA; JENNES, 2002). Estes ácidos graxos são derivados de três fontes principais:

(a) Da gordura corporal (50% do total de ácidos graxos). O escore de condição corporal é um importante determinante dos níveis de gordura do leite, especialmente no início da lactação (BLOWEY; EDMONDSON, 2010);

(b) Da dieta fornecida aos animais, principalmente os ácidos graxos de cadeia longa (C_{18}). Enquanto que os de tamanho de cadeia intermediária (C_{16}) podem ser 50% derivados da dieta e 50% podem ser sintetizados pela *síntese de novo* (FORSBÄCK, 2010c). Um exemplo eficaz de adição de ácidos graxos de cadeia longa na dieta de vacas em lactação é a utilização de gordura protegida (isto é, gordura, que tenha sido tratada, de modo que possa passar através do rúmen sem ser degradada). Esta prática de manejo nutricional leva ao aumento do teor de gordura do leite. Por outro lado, quando a dieta é baseada em ácidos graxos poliinsaturados e de cadeia curta, pode ocorrer diminuição do teor de gordura do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). O teor de gordura no leite é o componente mais influenciável pela dieta. A composição dos ácidos graxos e o percentual de gordura estão diretamente relacionados à dieta fornecida aos animais (KELLY, 2010).

(c) Finalmente, os ácidos graxos são sintetizados na glândula mamária pelo tecido secretor por meio da *síntese de novo*, que utiliza o acetato, produto de fermentação ruminal, para sintetizar ácidos graxos de cadeias entre C_4 e C_{14} (FORSBÄCK, 2010c). Alta proporção de fibra na dieta promovem níveis elevados de acetato no rúmen, e conseqüentemente, levam ao aumento na produção de gordura do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Portanto, a quantidade de volumoso ou fibra, a relação forragem:concentrado, carboidratos solúveis e lipídios na dieta, o consumo de alimentos ou a frequência de alimentação são fatores que podem afetar o teor de gordura no leite (FORSBÄCK, 2010c).

A produção de gordura é altamente variável, e isto se deve a fatores nutricionais, ao esvaziamento e preenchimento de leite no úbere, ordenha, e/ou distúrbios do tecido secretor mamário. Auldist et al. (1995) descreveram que a gordura do leite não apresenta um comportamento padrão de produção no decorrer da lactação, visto a alta correlação de fatores de variação. Entretanto, variação sazonal foi observada para todos os ácidos graxos do leite. A maior variação sazonal foi relatada para os ácidos graxos *trans*, ao passo que, as concentrações de $C_{16:1}$ *trans*-9; $C_{18:1}$ *trans*-11; e $C_{18:2}$ *cis*-9, *trans*-11 (CLA) foram duas vezes maior no verão em relação ao leite produzido no inverno (HECK et al., 2009b). O teor de gordura no leite aumenta nos momentos finais da ordenha. Neste contexto, Forsbäck et al. (2009; 2010a, b), descreveram a necessidade de se coletar todo o leite produzido pelo quarto mamário para realização de análises composicionais e CCS. O teor de gordura no leite é altamente dependente do esvaziamento do quarto mamário durante a ordenha, devido ao maior percentual do mesmo estar presente no leite residual, portanto o teor de gordura aumenta no decorrer da ordenha (TANCIN et al., 2007).

A mastite pode resultar em altos níveis de ácido graxos livres durante a secreção do leite e altos níveis de ácidos graxos não esterificados. A produção de gordura vai depender da severidade da infecção. Assim, o declínio da quantidade de gordura do leite é primeiramente resultado da redução da síntese e capacidade secretória da glândula mamária (FORSBÄCK, 2010c).

Resultados sobre a alteração da mastite sobre a produção de gordura são inconclusivos (FORSBÄCK, 2010b). Entretanto, independente das mudanças no teor de gordura, as propriedades físicas e composicionais sofrem mudança durante a mastite (SANTOS; MA; BARBANO, 2003). Auldist et al. (1995), relataram no leite de vacas com IIM, aumento nas concentrações de proteína total, nitrogênio não caseinoso e sódio, porém baixas concentrações de gordura, lactose, proteína verdadeira e potássio, quando comparado ao leite de vacas sadias. Entretanto, diferente de Auldist et al. (1995), decréscimo do teor de gordura de vacas com mastite foi observado por Bansal et al. (2005).

Schallibaum (2001) avaliaram o teor de gordura (g/100mL) de quatro grupos de quartos mamários com altas e baixas CCS (grupo A $<100 \times 10^3$ células/mL; B $<250 \times 10^3$ células/mL; C entre $500-1.000 \times 10^3$ células/mL; D $>1.000 \times 10^3$ células/mL) e relataram diminuição deste constituinte (grupo A=3,74g/100mL; B=3,69; C=3,51; e D=3,13) quanto maior os valores de CCS.

O tipo de bactéria presente durante a infecção provoca respostas imunes diferentes que alteram a produção e a qualidade do leite (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003). Portanto, a interação entre a bactéria e o sistema de defesa do hospedeiro é espécie-específico (LEITNER, et al., 2006). Entretanto, não foram relatadas diferenças estatísticas entre o teor de gordura de quartos infectados (*Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Escherichia coli*) e quartos sadios (LEITNER, et al., 2006). Por outro lado, Forsbäck et al. (2010b) avaliaram diferentes componentes do leite quanto as prováveis variações diárias (dia-a-dia), destes a gordura foi o componente que apresentou maior variação diária (7,7%) (FORSBÄCK et al., 2010b).

Forsbäck et al. (2010a) relataram que amostras compostas apresentam um efeito de diluição sobre amostras de leite por quartos mamários. Em outras palavras, a média dos componentes de uma amostra composta pode estar mascarando a presença de algum quarto com alteração, seja na produção, composição ou CCS. Não foi observado efeito do teor de gordura ao serem avaliados quartos infectados e quartos sadios amostrados por meio de três grupos de vacas quanto a CCS (grupo A $<50 \times 10^3$ células/mL; B entre 101 e 600×10^3 células/mL; e C $>700 \times 10^3$ células/mL). Ausência de efeito do teor de gordura entre

quartos sadios e infectados, e amostras de tanque, avaliados pela CCS também foram relatados por Forsbäck et al. (2009). Entretanto, foram relatadas interações significativas entre o teor de gordura e o estágio de lactação, bem como, interação com o tempo desde a última ordenha.

Além da enzima plasmina, o leite mastítico também tem um aumento do nível da enzima lipase. Isto conduz a degradação nos componentes da gordura do leite (ácidos graxos), a qual propicia sabor rançoso ao leite. Os níveis aumentados de ácidos graxos podem inibir culturas iniciadoras utilizadas na fabricação de queijo e iogurte, e pode também proporcionar sabor rançoso para estes produtos (SANTOS; FONSECA, 2007). A enzima lipase lipoprotéica tem sido detectada no leite de quartos com mastite subclínica, contudo a mesma não é a única responsável por toda a lipólise do leite, visto que algumas bactérias psicrotróficas podem produzir lipases de origem bacteriana (KELLY, 2010).

2.5.4 Efeito da CCS sobre a Proteína

Os aminoácidos são transportados para o úbere através da corrente sanguínea e são transformados em caseína pelas células mamárias alveolares. Uma vez formada, a caseína é extrudada a partir destas células por mecanismo semelhante ao das gotículas de gordura (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Outros tipos de proteínas presentes no leite em quantidades pequenas são albumina e globulinas. Estes são transferidos diretamente do sangue para o leite. Entretanto, a maioria das proteínas do leite está na forma de caseína. Das proteínas produzidas pelo tecido mamário ($\pm 90\%$) consistem principalmente em quatro diferentes variáveis genéticas de caseínas (α_1 , α_2 , β e κ) e dois tipos de proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) (HECK et al., 2009a). O leite ainda apresenta, além das proteínas e peptídeos, pequena fração (5%) de compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) (WALSTRA; JENNES, 2002). As proporções de α , β e κ -caseína do leite são 49, 35 e 10%, respectivamente (KELLY, 2010). As caseínas estão associadas com o formato das micelas com tamanho entre 10-300 nm. As micelas contém principalmente caseína, porém cálcio, fósforo, ácido cítrico e magnésio estão também incluídos (WALSTRA; JENNES, 2002). O teor de proteína do leite em média pode variar entre 3 a 3,6% (FORSBÄCK, 2010c).

A capacidade genética das vacas contribui fortemente para o teor e a composição de proteínas no leite (FORSBÄCK et al., 2010b). Em adição, fatores fisiológicos como o estágio de lactação também contribuem para variações no teor e composição deste componente do leite (AULDIST et al., 1995; URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999). O teor de proteína do leite pode também ser afetado pela alimentação, porém muito menos do que quando comparado ao teor de gordura (FORSBÄCK et al., 2010c). Por outro lado, o conteúdo de energia da dieta tem importante efeito sobre o teor de caseína do leite, ao contrário da proteína de origem dietética que tem relativamente pouca influência sobre o teor da proteína do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010).

À medida que aumenta a CCS, ocorre diminuição na relação teor de caseína e teor de proteína total, entretanto aumentam os níveis de albumina e globulina oriundos do sangue (AULDIST et al., 1995; AULDIST; HUBLLE, 1998; URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999; LEITNER et al., 2006; FORSBÄCK et al., 2009; FORSBÄCK et al., 2010a, b). O aumento na concentração de proteínas do sangue no leite leva ao aumento na proporção de nitrogênio não-caseínoso (NNC). Isto se deve à redução da síntese de caseína (α e β -caseínas) pelas células secretoras e pelas alterações na permeabilidade vascular, que levam à passagem de maiores quantidades de proteínas de origem sanguínea para o leite (AULDIST; HUBLLE, 1998; URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999). Sendo assim, o teor de proteína total do leite pode, por conseguinte, permanecer constante, mas o leite permanece de qualidade inferior, o que representa um problema para a fabricação de derivados lácteos. Além disso, o aumento da CCS leva a proteólise da caseína e influencia negativamente à firmeza de coagulação pela mesma (LEITNER et al., 2006).

O leite mastítico apresenta alta concentração de enzimas proteolíticas (ex. plasmina) liberadas pelas células de defesa, que decompõe a caseína do leite armazenado e consequentemente alteram o sabor e o tempo de prateleira dos derivados lácteos (SANTOS; MA; BARBANO, 2003; LEITNER et al., 2006). A proteólise da caseína leva ao decréscimo na proporção relativa de caseína, especialmente β -caseína e α_{s1} -caseína, a qual simultaneamente aumentam as frações de λ -caseína e γ -caseína, respectivamente. A coagulação da caseína é decisiva como parte do processo inicial para a produção de queijo e iogurte, uma vez que a ausência da coagulação ou menor firmeza de coágulo diminuem o rendimento destes derivados lácteos (LEITNER et al., 2006). Além disso, a plasmina não é destruída pela pasteurização e permanece ativa mesmo a 4°C (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Desta forma, sistemas de pagamento baseados em porcentagem de proteína total, sem

levar em conta a CCS, apresentam limitações, uma vez que o rendimento industrial do leite está associado principalmente à fração de caseína (AULDIST; HUBLLE, 1998).

Schallibaum (2001) avaliou os teores de caseína e proteínas do soro (g/100mL) de grupos de quartos mamários com altas e baixas CCS (grupo A <100x10³ células/mL; B <250x10³ células/mL; C entre 500-1.000x10³ células/mL; D >1.000x10³ células/mL) e relataram maior produção de caseína quando a CCS apresentou-se baixa (<100x10³ células/mL), seguido de diminuição da mesma na presença de CCS altas; entretanto, para o teor de proteínas do soro foi relatado efeito inverso, onde a menor produção foi observada em CCS baixa (<100x10³ células/mL), seguido de aumento diretamente proporcional ao aumento da CCS.

Forsbäck et al. (2010b) avaliaram diferentes componentes do leite quanto a variação diária (dia-a-dia). Os teores de proteína total, proteínas do soro e caseína apresentaram variação média diária de 1,4%; 1,8% e 1,8%; respectivamente. Ao serem avaliadas amostras compostas de leite de quartos sadios e com mastite subclínica no decorrer do ciclo lactacional, a CCS apresentou-se diretamente proporcional ao teor de proteína total (AULDIST et al., 1995). Resultados similares foram descritos por Bansal et al. (2005) que avaliaram amostras de quartos mamários infectados e sadios, porém sem o efeito de ciclo lactacional.

Em outro estudo, não foram relatadas diferenças estatísticas entre os teores de proteína total e caseína (g/L) de quartos infectados (*Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Escherichia coli*) e quartos sadios (LEITNER, et al., 2006). Entretanto, estes mesmos pesquisadores descreveram aumento nos teores de proteínas do soro (% e g/L) e plasmina (U/mL) nas mesmas condições de comparação, entre quartos sadios e infectados.

Mudanças nas frações de proteína do leite foram avaliadas por meio da comparação de quartos mamários infectados e sadios (URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999). Desta avaliação, foram relatadas diferenças significativas para o teor de proteínas do soro, amostradas do leite de balde, entre os quartos sadios (12,9%) e infectados (14,3%). Por outro lado, não houve diferença estatística quando adotada as mesmas condições para os teores de proteína, caseína, e frações da caseína (α , β +k, e γ).

Forsbäck et al. (2009) relataram que a composição do leite é similar entre quartos traseiros e dianteiros quando a CCS <100x10³ células/mL. O mesmo foi relatado por Berglund et al. (2007). Entretanto, Forsbäck et al. (2010a) avaliaram quartos mamários sadios (CCS <100x10³ células/mL) e infectados (CCS >100x10³ células/mL) de vacas inicialmente

selecionadas por amostragem composta de $CCS < 100 \times 10^3$ células/mL e descreveram que houve diferença significativa entre quartos para as variáveis teor de proteína total (aumentou com aumento da CCS), proteínas do soro (aumentou com aumento da CCS), e caseína (diminuiu com aumento da CCS).

2.5.5 Efeito da CCS sobre a Lactose

A glicose é produzida no fígado, principalmente a partir de propionato, um produto de fermentação do rúmen. Depois de ser transferida para o úbere, parte da glicose é convertida em outro açúcar simples, galactose. Em seguida, uma molécula de glicose combina-se com uma de galactose para produzir a lactose (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Devido a este mecanismo bioquímico, a lactose é sintetizada exclusivamente por uma enzima no tecido secretor da glândula mamária, mais especificamente dentro do complexo de Golgi por meio da *lactose sintase*, que é derivada da *galactosil-transferase* e α -lactalbumina (FORSBÄCK, 2010c; WALSTRA; JENNES, 2002)

O carboidrato mais comum no leite é a lactose, a qual está presente em 4,5 a 5% no leite bovino (KELLY, 2010). Além disso, a lactose é o componente mais estável do leite em vacas sadias, a qual se apresenta constante durante as estações do ano (HECK et al., 2009b), e entre os demais componentes é o que apresenta menor variação diária (0,9%) (FORSBÄCK et al., 2010). Por outro lado, Auldist et al. (1995) descreveram que ocorrem variações no teor de lactose durante as fases lactacionais, o qual está aumentado no início da lactação (primeira fase pós-parto), seguido de diminuição com o decorrer da lactação. Entretanto, Forsbäck et al. (2009) avaliaram 3 grupos de vacas com quartos mamários de CCS diferentes e relataram ausência de efeito do estágio lactacional sobre o teor de lactose. Além disso, considera-se que o conteúdo de lactose não pode sofrer variações devido a fatores associados à dieta animal (FORSBÄCK et al., 2010c).

A lactose é o principal determinante da função osmótica do leite (fator que regula a concentração dos componentes do leite em solução). Em outras palavras, este componente determina o quanto de água é carregado ao leite (KELLY, 2010). O teor de lactose aumenta na vesícula de Golgi, devido ao fato de esta ser impermeável para lactose, e ao mesmo tempo, altamente permeável para a água que se difunde do citosol para dentro da vesícula por osmose (FORSBÄCK et al., 2010b, c). Por outro lado, a pressão osmótica do leite é mantida pelo

balanço da concentração de lactose e dos minerais solúveis. Portanto, mudanças nos teores de sódio e potássio do leite resultam em reduzida síntese de lactose, e consequentemente, redução da produção de leite (STELWAGEN; FARR; MCFADDEN, 1999).

Decréscimo do teor de lactose é frequentemente correlacionado com distúrbios no processo de secreção, o que acontece durante o processo de IIM (MUNRO et al., 1984; AULDIST et al., 1995; URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999; BANSAL et al., 2005; BERGLUND et al., 2007; FORSBÄCK et al. 2009; FORSBÄCK et al. 2010a, b, c; SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). Os danos ao tecido secretor (células epiteliais) de leite são causados por IIM, a qual conduz ao aumento da permeabilidade devido ao enfraquecimento das junções celulares e a falha na barreira sangue-leite, o que possibilitam perdas de lactose para o sangue (ALLEN et al., 1990; BARBANO; RASMUSSEN; LYNCH, 1991). Quando as junções celulares tornam-se enfraquecidas, há influxo de sódio e cloro para dentro do lúmen alveolar, entretanto ocorre diminuição do potássio. Esta é uma das causas do sabor amargo e ligeiramente salgado de leite mastítico. Além disso, estas alterações também podem ser usadas para ajudar a avaliar a mastite por condutividade elétrica, uma vez que o sódio e o cloro são condutores elétricos melhores do que a lactose (BLOWEY; EDMONDSON, 2010).

Adicionalmente, a lesão tecidual ocasionada pela mastite afeta significativamente a quantidade de leite produzida, o que pode ser comprovado pela redução da capacidade de síntese e aferição de concentrações elevadas de lactose no sangue e urina de vacas com mastite (FORSBÄCK et al. 2010c). O teor de lactose pode ser uma ferramenta útil na detecção de infecções intramamárias (HARMON, 1994; AULDIST et al., 1995), especialmente em nível de quarto mamário, uma vez que foi observado decréscimo deste componente em amostras, até mesmo, com moderada CCS (BERGLUNDO et al., 2007).

Schallibaum (2001) avaliaram o teor lactose (g/100mL) de grupos de quartos mamários com altas e baixas CCS (grupo A <100x10³ células/mL; B <250x10³ células/mL; C entre 500-1.000x10³ células/mL; D >1.000x10³ células/mL) e relataram maior produção deste componente quando a CCS apresentou-se baixa (<100x10³ células/mL), seguido de diminuição do mesmo na presença de CCS altas, o que indica que a CCS e o teor de lactose estão relacionadas de forma inversamente proporcionais.

Ao serem avaliadas amostras compostas de leite de quartos sadios e com mastite subclínica no decorrer do ciclo lactacional, a CCS apresentou-se inversamente proporcional ao teor de lactose (AULDIST et al., 1995). Resultados similares foram descritos por Bansal et

al. (2005) que avaliaram amostras de quartos mamários infectados e sadios, porém sem o efeito de ciclo lactacional. Diferenças estatísticas altamente significativas foram relatadas para o teor de lactose (mM) entre quartos infectados por *Streptococcus dysgalactiae* (123mM), *Staphylococcus aureus* (136mM), *Staphylococcus chromogenes* (140mM) e *Escherichia coli* (124mM) e quartos sadios (144mM) (LEITNER, et al., 2006).

No estudo de Urech, Puhon e Schällibaum (1999) o teor de lactose foi avaliado por meio de cinco diferentes formas de amostragens de leite: (1) primeiros jatos; (2) leite de balde ao pé; (3) jatos finais após ordenha; (4) leite residual (com estimulação de ocitocina intravenosa logo após ordenha); e (5) leite jovem (com estimulação de ocitocina intravenosa 2 horas após ordenha); junto a isto, avaliaram-se os efeitos de quartos sadios e infectados. Houve diminuição significativa do teor de lactose do leite produzido por quartos infectados em relação aos sadios amostrados pela forma 5.

2.5.6 Efeito da CCS sobre os demais componentes do leite

Além dos principais componentes (água, gordura, proteína e lactose), o leite contém numerosas diferentes substâncias com baixo peso molecular chamados de sais minerais. Muitos destes sais contidos no leite exercem auxílio na manutenção da estrutura das micelas de caseína, e alguns deles estão ligados às proteínas do soro, seja na forma ionizada ou não ionizada. Os principais sais aniônicos no leite, em ordem quantitativa decrescente (mg/mL) são: potássio (172,5 mg/mL), cálcio (130 mg/mL), sódio (43,6 mg/mL) e magnésio, enquanto os principais cátions incluem o cloreto, sulfato, carbonato, fosfato e citrato. Mesmo que a concentração de minerais tenha pequeno percentual, 0,6-0,8% do peso do leite, as mudanças na sua concentração em resposta à mastite podem influenciar de maneira significativa as características funcionais do leite para o processamento (AUDIST; HUBLLE et al., 1998; SANTOS, 2001; FORSBÄCK, 2010c).

O cálcio e o fósforo representam a fração de sais associada com as micelas de caseína, na forma de um complexo de fosfocaseinato de cálcio. Eles são minerais importantes na estabilização das micelas. Na presença da mastite, a síntese de caseína fica prejudicada e os minerais incorporados nelas apresentam baixa concentração. Variações devido à mastite também acontecem com a concentração de potássio, que diminui por passar do leite para o sangue, e do sódio e cloro, que aumentam por advir do sangue (STELWAGEN; FARR; MCFADDEN, 1999; KELLY, 2010).

Todas as vitaminas estão presentes no leite, algumas em pequenas concentrações como, por exemplo, a vitamina C. Embora, o conteúdo de vitaminas A e B, em particular, tornam o leite uma das maiores fontes dessas duas classes de vitamina (FORSBÄCK, 2010c).

3 IDENTIFICAÇÃO DE *Corynebacterium* spp. ISOLADOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI/TOF)

RESUMO

A mastite bovina é causada principalmente por infecções bacterianas e *Corynebacterium* spp. é um dos principais micro-organismos contagiosos isolados de infecção intramamária (IIM) subclínica em vacas leiteiras. No entanto, não existem métodos simples para identificação das espécies do gênero *Corynebacterium* spp. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI/TOF-MS) para a identificação das espécies de *Corynebacterium* spp. isoladas de quartos mamários. Amostras de leite foram coletadas de 1.242 vacas leiteiras de 21 fazendas, totalizando 2.382 amostras de leite as quais foram submetidas à cultura microbiológica. Para a análise através da técnica de MALDI/TOF-MS, o isolado bacteriano foi descongelado e cultivado durante 72 horas. Para a lise e extração bacteriana, foi utilizado o método em tubo utilizando-se ácido fórmico/acetonitrila. Amostras identificadas por MALDI/TOF-MS foram submetidas ao sequenciamento de genes 16S rRNA. Um total de 222 amostras foram identificadas por MALDI/TOF-MS como *Corynebacterium* spp. Destas, *Corynebacterium bovis* foi o mais frequentemente isolado (n = 208). Espécies não-lipofílicas representaram 4,5% do total de isolados (n=10), destes *C. auriscanis* (n=3), *C. xerosis* (n=3), *C. amycolatum* (n=1), *C. casei* (n=1), *C. efficiens* (n=1), *C. pseudotuberculosis* (n=1). Apenas quatro amostras (1,8%) não foram identificadas ao nível de espécie, *Corynebacterium* spp. Houve equivalência de resultados de 95% entre as duas técnicas de identificação utilizadas. A técnica de MALDI/TOF-MS com o uso da lise e extração por ácido fórmico/acetonitrila foi aplicada com 91,57% de sensibilidade de identificação das espécies de *Corynebacterium* nos casos de mastite bovina subclínica, quando comparado aos resultados do sequenciamento de genes 16S rRNA.

Palavras-chave: Mastite subclínica. *Corynebacterium* spp. Espectrometria de massas.

Abreviações: MALDI/TOF-MS = Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz.

ABSTRACT

The bovine mastitis is mainly caused by bacterial infections and *Corynebacterium* spp. is one of the most important contagious microorganisms isolated from intramammary infection (IMI) in subclinical cows. However, there are no simple methods to identify the species of the

genus *Corynebacterium* spp. The objective of this study was to evaluate the technique of Mass Spectrometry Desorption Ionization and Matrix-Assisted Laser - Time of Flight (MALDI/TOF-MS) to identifying the species *Corynebacterium* spp. isolated from mammary quarters. Milk samples were collected from 1242 dairy cows on 21 farms, totaling 2382 milk samples which were submitted to microbiological culture. For analysis using the technique of MALDI/TOF-MS, the bacterial isolate was thawed and cultured for 72 hours. Bacterial lysis and extraction was performed by the tube method using formic acid/acetonitrile. Isolates identified by MALDI/TOF-MS were subjected to gene sequencing of 16S rRNA. A total of 222 isolates were identified by MALDI/TOF-MS as *Corynebacterium* spp. of which, *Corynebacterium bovis* were the most isolated (n = 208). Species non-lipophilic represented 4.5% of isolates (n = 10) of these *C. auriscanis* (n = 3), *C. xerosis* (n = 3), *C. amycolatum* (n = 1), *C. casei* (n = 1), *C. efficiens* (n = 1), *C. pseudotuberculosis* (n = 1). Only four samples (1.8%) were not identified to the species level. There were equivalence results of 95% between the two identification techniques used. The technique of MALDI/TOF-MS using the tube-extraction by formic acid/acetonitrile was applied with 91.57% sensitivity for identifying the species of *Corynebacterium* on cases of bovine mastitis subclinical when compared to the results of genes sequencing 16S rRNA.

Key words: Subclinical mastitis. *Corynebacterium* spp. Mass spectrometry.

Abbreviation: MALDI/TOF-MS = matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

3.1 Introdução

A mastite bovina é a doença que gera os maiores prejuízos na produção leiteira, e é definida como uma inflamação da glândula mamária. Esta doença afeta tanto a qualidade do leite quanto o rendimento, e pode acarretar rápida transmissão da infecção entre vacas do rebanho. *Corynebacterium* spp. é um micro-organismo contagioso e frequentemente isolado como causador de infecção intramamária subclínica (BARKEMA et al., 1997; WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997; SCHEPERS et al., 1997; BRITO et al., 1999a; HALTIA et al., 2006; SCHUKKEN et al., 2009).

A maioria dos testes microbiológicos para diagnóstico de *Corynebacterium* spp. causadores de IIM são voltados para identificação de *C. bovis*, que é a espécie mais prevalente (WATTS et al., 2000; HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004). Estes testes são baseados em características fenotípicas, como o crescimento de colônias em 48 horas das cepas em meios com suplementação de ácidos graxos. No entanto, o uso destas características para o diagnóstico espécie-específico leva a resultados incoerentes (COYLE; LIPSKY, 1990;

WATTS et al., 2000). Sendo assim, são comuns diagnósticos microbiológicos de *Corynebacterium* spp. causadores da mastite bovina apenas com a identificação de gênero.

Não existem métodos simples para identificação das espécies de *Corynebacterium*. Além disso, pode ocorrer até 30% de erro de identificação de *Corynebacterium* spp. pelo método da microbiologia convencional (COYLE; LIPSKY, 1990; WATTS et al., 2000). A identificação de *Corynebacterium* spp., é realizada com o objetivo principal de diferenciá-las dos demais bastonetes com caráter mais patogênico, como a *Nocardia* spp. (HARMON et al., 1990; HOGAN et al., 1999). Portanto, a identificação apenas por gênero parece estar vinculada com a importância de *Corynebacterium* spp. a sanidade do tecido mamário, os quais são responsáveis por moderadas contagens de células somáticas (CCS) (BRADLEY; GREEN, 2005; SCHUKKEN et al., 2009).

A alta prevalência de *Corynebacterium* spp. tem sido relatada sem a existência de uma técnica rápida de identificação das espécies. Entretanto, Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI/TOF-MS) é uma técnica inovadora, de rápido diagnóstico para identificação de bactérias, devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas, e ainda por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (SIUZDAK, 2006). A análise de proteínas biomarcadoras, únicas e representativas para cada micro-organismo, constitui a base das aplicações atuais da espectrometria de massas para caracterização de bactérias (WELKER, 2011). Os patógenos primários causadores de IIM bovina foram identificados por meio da técnica de MALDI/TOF-MS (BARREIRO et al., 2010). As espécies de *Corynebacterium* spp. de amostras clínicas humanas foram identificadas por espectrometria de massas (BARREIRO et al., 2010; THEEL et al., 2012). Entretanto, não existem relatos de identificação destas espécies causadores de IIM bovina por MALDI/TOF-MS. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a técnica MALDI/TOF-MS para a identificação das espécies de *Corynebacterium* isoladas de quartos mamários com mastite.

3.2 Materiais e métodos

Seleção de rebanhos e de vacas

Foram coletadas amostras compostas de leite de 1.242 vacas em lactação, distribuídas em 21 rebanhos leiteiros comerciais da região de Pirassununga, São Paulo, as quais foram submetidas à cultura microbiológica para diagnóstico de mastite causada por

Corynebacterium spp. Os rebanhos foram selecionados com base na proximidade do laboratório e presença de equipamento de ordenha mecânica. As amostras de leite foram coletadas seguindo os procedimentos recomendados pelo Conselho Nacional de Mastite (NMC, 1999), e foram acondicionadas em caixas térmicas (5°C), as quais foram transportadas ao laboratório e imediatamente congeladas.

As amostragens foram realizadas em duas etapas: a primeira foi realizada por coleta de amostras compostas de leite de todas as vacas em lactação (n=1.242), para isolamento dos animais infectados por *Corynebacterium* spp. Na segunda, em um prazo inferior a 15 dias, do total de vacas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. (n=285), foram realizadas coletas de amostras de leite por quartos mamários (n=1.140). Das amostras de quartos mamários foram isolados *Corynebacterium* spp. (n=351), os quais foram criopreservados em meio de cultura sob temperatura de -20°C. Os isolados de *Corynebacterium* spp. foram recultivados para identificação espécie-específica. Deste total, n=66 amostras não apresentaram crescimento, n=25 foram consideradas contaminadas por apresentarem mais de um agente bacteriano e n=39 apresentaram baixa similaridade a sequências referência do banco de dados (<98%). O restante (n=221) foram identificados por MALDI/TOF-MS e sequenciamento de genes 16S rRNA.

Identificação bacteriana por cultura microbiológica

As amostras de leite foram descongeladas, homogeneizadas e submetidas ao plaqueamento em prazo inferior a 15 dias da coleta. Para cada amostra, 10 µL de leite foram estriados em ágar sangue com 5% de sangue bovino desfibrinado e em ágar trípico de soja (TSA) suplementado com 1% de Tween 80° (WATTS et al., 2000). Este suplemento foi utilizado devido às espécies lipofílicas de *Corynebacterium* spp. apresentarem baixo crescimento em ágar sem adição de ácido graxos (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004). As placas foram incubadas aerobicamente à 37°C por 72h, e após incubação foram feitas leituras a cada 24 h quanto às características coloniais (nº de colônias, pigmentação, tamanho, presença de hemólise) e presença de contaminantes. O exame de esfregaços corados pelo método de Gram e o teste da catalase foram realizados para verificar a morfologia, a coloração dos micro-organismos isolados e a diferenciação entre gêneros. Assim, foram considerados *Staphylococcus* spp., micro-organismos cocos Gram positivos catalase positiva; *Streptococcus* spp., cocos Gram positivos catalase negativa; *Arcanobacterium pyogenes*,

bastonetes Gram positivos catalase negativa; e *Corynebacterium* spp. / *Nocardia* spp. / *Bacillus* spp. / *Arcanobacterium* spp., bastonetes Gram positivos catalase positiva. Para os cocos Gram positivos foram realizadas provas da coagulase para diferenciação dos patógenos em *Staphylococcus* coagulase positiva (CPS) ou *Staphylococcus* coagulase negativa (CNS). *Staphylococcus aureus* foram identificados quando a prova da acetoina foi positiva. Microorganismos Gram negativos foram identificados apenas como bastonetes ou cocobacilos Gram negativos.

A identificação dos isolados de *Corynebacterium* spp. foi realizada através da identificação de colônias pequenas (entre +/- 1 mm de diâmetro), circulares, branco para cinza ou amarelada, levemente elevadas, secas e/ou friáveis, não hemolíticas, com reação positiva na prova da catalase e coloração de Gram positiva. Os isolados bacterianos submetidos à microscopia apresentaram-se como bastonetes irregulares (hastes empalisadas ou ligeiramente curvadas, tipo “letras chinesas”, frequentemente arrançadas em formação de V), sem motilidade e com ausência de esporos. Apenas os isolados de *Corynebacterium* spp. foram criopreservados. Todos os isolados foram mantidos em 1 mL de caldo de triplicase soja (TSB) contendo 10% de glicerina sob temperatura de -20°C. Amostras que produziram mais do que um isolado morfológicamente diferente foram consideradas contaminadas.

Preparo de amostras para MALDI/TOF-MS

Para preparar as amostras para MALDI/TOF MS, as cepas bacterianas isoladas a partir do leite foram descongeladas e centrifugadas (todas as centrifugações foram realizadas a 13.000 xg durante 2 min em centrífuga da marca Eppendorf® 5417R). Peletes bacterianos foram adicionados de 300 µL de água Milli-Q (Millipore Corporation) autoclavada e 900 µL de etanol grau HPLC, seguidos de homogeneização por um minuto. Para completa retirada do sobrenadante realizou-se centrifugação e remoção com pipeta automática. Os peletes bacterianos foram deixados secar em temperatura ambiente durante 5 a 10 min.

Protocolo de lise e extração por ácido fórmico/acetonitrila

Solução de ácido fórmico 70% (10-50 µL) foi adicionado aos peletes bacterianos proporcionalmente ao tamanho do sedimento para dissolvê-lo completamente. Subsequentemente, acetonitrila 100% foi adicionada em cada amostra em volumes iguais de solução de ácido fórmico 70% adicionado, produzindo assim extrato bacteriano em razão de

1:1 de ácido fórmico 70% e acetonitrila. Uma última centrifugação foi realizada para separar detritos de células bacterianas a partir do sobrenadante que continha as proteínas ribossômicas do interior de células utilizadas para a identificação por MALDI/TOF-MS (BARREIRO et al., 2010).

Preparação da placa utilizada em MALDI/TOF-MS

Foram aplicados 1 µL dos extratos bacterianos aos spots da placa de aço (MSP 384 polished-steel target; Bruker Daltonik, Bremen, Germany) e deixados secar em temperatura ambiente. Os spots secos foram sobrepostos com 1 µL de solução de matriz, que consistiu de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em acetonitrila a 50% e de ácido trifluoroacético 2,5% (BRUKER DALTONICS, 2010). Após a adição da matriz, os spots foram deixados secar em temperatura ambiente (~7 min) para realização das análises em espectrômetro de massas.

Uma solução padrão de proteínas (Bacterial Test Standard, BTS; Bruker) foi utilizada para calibração do equipamento. Um controle positivo (*Escherichia coli*) e controle negativo (ácido fórmico e matriz) foram analisados em cada rodada. A análise por MALDI/TOF-MS foi realizada em equipamento Autoflex III Smartbeam Bruker operado em modo linear e equipado com laser de nitrogênio 337 nm. Os dados foram adquiridos por meio do software FlexControl 3.3 (BRUKER DALTONICS, 2010). Os espectros de massa foram coletados num *range* de massa de 2.000 a 20.000 m/z. Três mil disparos de laser foram acumulados para gerar cada espectro. A base de dados utilizada para identificação dos microorganismos foi o MALDI Biotyper 3.0 em configurações padrão (BRUKER DALTONICS, 2010). Para cada amostra analisada em modo automático, o software Flexcontrol 3.3 gerava um *fingerprint* (conjunto de picos), os quais foram utilizados para coincidir com os da biblioteca referência do software Biotyper 3.0. O resultado foi baseado no algoritmo (score) lançado pelo software Biotyper 3.0. Valores de escores maiores que 1.7 foram considerados confiáveis para a provável identificação de gênero, e escores maiores que 2.0 foram considerados confiáveis para identificação do gênero e provável identificação de espécies.

Protocolo de extração do DNA genômico para o sequenciamento de genes 16S rRNA (SeqGEN)

Foram utilizados 100 µL do DNA (células bacterianas em caldo de TSB diluídos dez vezes em água milliQ autoclavada) e adicionados de 100 µL de tampão de lisozioma com 0,4 mg de lisozioma. A solução de bactéria e enzima foi deixada a temperatura ambiente por 15 minutos. Subsequentemente, foram adicionadas 100 µL de resina a 10 mg/mL (Chelex®100 BIO-RAD). A solução mistura foi aquecida a 99°C por 10 min e centrifugada (16.000 Xg, por 10 min). Apenas o sobrenadante foi conservado por conter o material genômico extraído.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Cinco microlitros da amostra foram submetidos à PCR (volume de 50 µL) com uso do 2x Master Mix® (Promega). Dois pares de *primer* foram utilizados para amplificação. Inicialmente foi utilizado o par de *primer* F-5'GCGAACGGGTGAGTAACACG3' e R-5'TCTGCGATTACTAGCGACTCCG3' com o objetivo de amplificar as espécies de *Corynebacterium* lipofílicas (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004). Amostras não amplificadas foram submetidas à PCR com um par de *primer* universal (F-5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' e R-5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') (WATTS et al., 2000). Foram utilizadas as recomendações de ciclo para cada *primer* conforme literatura referenciada (WATTS et al., 2000; HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004).

Gel de eletroforese e purificação do DNA

Os produtos resultantes da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% preparado com TBE (Tris/Borato/EDTA). Foram aplicados 4 µL de marcador molecular de 100 pares de base (pb) DNA Ladder® (Life Technologies) nos primeiros poços de cada gel, e controle negativo (Mix+primers) nos últimos poços de cada gel. Após 30 minutos de corrida (5 min a 80 volts e 25 min a 100 volts), as bandas de 1.250 pb foram visualizadas por meio de equipamento transiluminador. As bandas de interesse foram cortadas, e em seguida, purificadas por meio do kit de purificação de bandas em gel (GE HEALTH CARE ilustra™ GFX™), de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de sequenciamento e protocolo de precipitação

Produtos purificados da PCR foram unidirecionalmente sequenciados com *primer reverse*. A reação de sequenciamento consistiu em 1 µL de primer R; 1,5 µL de tampão5X; 2 µL DNA purificado a 20ng/µL; 4,5 µL de água livre de nucleases e 1 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). As condições de ciclo foram as mesmas utilizadas pelos primers na PCR. Para o protocolo de precipitação foram realizadas 2 lavagens com etanol (Sigma). Na primeira foram utilizados 21 µL de etanol absoluto, deixados em temperatura ambiente por 5 min, e centrifugados por 30 min a 15°C em 3.000 *rcf*. Na seguinte foram utilizados 35 µL de etanol 70%, e centrifugados por 15 min a 15°C em 1.650 *rcf*. O etanol foi descartado por inversão das placas, que foram seguidas de aquecimento a 95°C por 8min, e aplicação de 10 µL de formamida Hi-Di™ (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas com um sequenciador de capilares automático ABI 3500 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems).

Identificação baseada no gene 16S rRNA

Todas as sequências obtidas do gene 16S rRNA foram alinhadas por meio do software Mega 5.0, e em seguida confirmadas pela biblioteca de dados on-line do NCBI. Os isolados foram considerados identificados em nível de espécies se a similaridade com uma sequência referência fosse igual ou superior a 98%. A figura 1 apresenta uma comparação entre o fluxo de trabalho de identificação pela MALDI/TOF-MS e o sequenciamento de genes 16S rRNA (SeqGEN) por amostra.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico S.A.S® versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA), por meio do teste McNemar de proporções pareadas. Valores encontrados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Figura 1 - Comparação entre o fluxo de trabalho de identificação pela MALDI/TOF-MS e o SeqGEN por amostra

3.3 Resultados

Para seleção dos animais do presente estudo, foram coletadas amostras compostas de leite (n=1.242) para identificar vacas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. Com base nos resultados de amostras compostas, *Corynebacterium* spp. (n=285; 22,9%) e SCN (n=224; 18%) foram os agentes mais isolados de vacas infectadas por mastite subclínica. Além destas, 197 vacas (15,8%) estavam infectadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e 193 vacas (15,5%) estavam infectadas por *Streptococcus* spp. (Tabela 8). Do total de amostras compostas, 21,25% (n=264) não apresentaram crescimento e 1,29% (n=16) foram excluídas por contaminação.

Do total de amostras compostas com isolamento de *Corynebacterium* spp. (n=285), foram coletadas amostras de quartos mamários (n=1.140). Os micro-organismos mais prevalentes nas amostras por quarto mamário foram do gênero *Corynebacterium* spp. (n=351; 30,76%), 38,9% (n=443) não apresentaram crescimento e 1,4% (n=16) foram excluídas por contaminação. Os patógenos secundários corresponderam a 70,6% das amostras por quartos mamários (Tabela 8).

Isolados de *Corynebacterium* spp. (n=351) foram recultivados para identificação espécie-específica. Deste total, 1/8,8% das amostras (n=66) não apresentaram crescimento, e 7,1% (n=25) foram consideradas contaminadas por apresentarem mais de um agente bacteriano. Sendo assim, foram utilizados 260 isolados de *Corynebacterium* spp. para o SeqGEN, dos quais 15% não foram identificados (n=39), sendo 10,8% (n=28) devido à baixa similaridade (<98%) com as sequências referência dos bancos de dados do NCBI, e 4,2% (n=11) por não terem apresentado sequência após três tentativas de identificação. Das amostras excluídas (n=18), o sequenciamento foi sugestivo para mais de uma espécie de *Corynebacterium* (Figura 2). Um total de n=221 isolados apresentou alta similaridade às sequências referência ($\geq 98\%$). Destas, 86% (n=190) foram identificadas como *Corynebacterium* spp., e 14% (n=31) como corineformes (Tabela 9 e 10). Do total de cepas de *Corynebacterium* spp. identificadas pelo SeqGEN, foram encontradas 11 espécies diferentes, 92,63% (n=176) foram lipofílicos, e 7,36% (n=14) foram não lipofílicos.

Tabela 8 - Isolados bacterianos nas duas etapas de coleta: amostras compostas e por quartos mamários bovinos.

Micro-organismo	Amostras compostas			Amostras por quartos mamários		
	Frequência Absoluta (n)	Frequência relativa (%)	Culturas positivas (%)	Frequência Absoluta (n)	Frequência relativa (%)	Culturas positivas (%)
Amostras avaliadas	1,242			1,140		
Amostras sem isolamento	264	21,25		443	38,9	
Amostras com isolamento	978	78,75		697	61,1	
<i>Corynebacterium</i> spp.	285	22,98	29,14	351	30,76	50,3
SCN ¹	224	18,06	22,9	141	12,36	20,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	168	13,55	17,17	42	3,68	6,0
Outros SCP ²	29	2,34	2,96	31	2,72	4,45
<i>Streptococcus</i> spp.	193	15,56	19,73	68	5,96	9,75
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	18	1,45	1,84	16	1,40	2,3
<i>Bacillus</i> spp.	34	2,74	3,47	19	1,67	2,72
Enterobactérias	3	0,24	0,3	3	0,26	0,43
Leveduras	5	0,40	0,5	3	0,26	0,43
<i>Nocardia</i> spp.	1	0,08	0,1	4	0,35	0,57
<i>Prothoteca</i> spp.	2	0,16	0,2	3	0,26	0,43
Contaminação ³	16	1,29	1,63	16	1,4	2,3
Grupo de patógenos ⁴						
Patógenos primários	390	31,4	39,9	141	12,35	20,3
Patógenos secundários	509	41	52	492	43,12	70,6

¹*Staphylococcus* coagulase negativa. ²*Staphylococcus* coagulase positiva. ³Culturas microbiológicas com crescimento de mais de um micro-organismo. ⁴Patógenos primários= *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; Patógenos secundários= *Staphylococcus* coagulase-negativa e *Corynebacterium* spp.

Tabela 9 - Isolados de *Corynebacterium* spp. identificados por sequenciamento de genes 16S rRNA versus MALDI/TOF-MS.

Sequenciamento de genes 16SrRNA Isolados (n)	Similaridade rRNA	MALDI/TOF-MS Isolados (n)	Escore MALDI
<i>Corynebacterium bovis</i> (176)	>98%	<i>Corynebacterium bovis</i> (159) <i>Corynebacterium bovis</i> (3) <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (1) <i>Arthrobacter globiformis</i> (1) <i>Bacillus clausii</i> (1) <i>Bacillus licheniformis</i> (1) <i>Curtobacterium luteum</i> (1) <i>Curtobacterium luteum</i> (1) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (1) <i>Propionibacterium acnes</i> (1) Sem identificação (6)	>2,0 Entre 1,7 e 1,99 Entre 1,7 e 1,99 >2,0 >2,0 Entre 1,7 e 1,99 >2,0 Entre 1,7 e 1,99 Entre 1,7 e 1,99 >2,0 <1,7
<i>Corynebacterium amycolatum</i> (2)	>98%	<i>Corynebacterium</i> sp. (1) <i>Lactobacillus fructivorans</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99 Entre 1,7 e 1,99
<i>Corynebacterium aquilae</i> (2)	>99%	<i>Corynebacterium</i> sp.(2)	>2,0
<i>Corynebacterium auriscanis</i> (1)	99%	<i>Corynebacterium auriscanis</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Corynebacterium auriscanis/resistens</i> (1)	99%	<i>Corynebacterium auriscanis</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Corynebacterium xerosis</i> (1)	>99%	<i>Corynebacterium xerosis</i> (1)	>2,0
<i>Corynebacterium xerosis/freneyi/hansenii</i> (4)	>98%	<i>Corynebacterium xerosis</i> (3) <i>Paenibacillus lactis</i> (1)	>2,0 >2,0
<i>Corynebacterium casei</i> (1)	99%	<i>Corynebacterium casei</i> (1)	>2,0
<i>Corynebacterium efficiens</i> (1)	99%	<i>Corynebacterium efficiens</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Corynebacterium variabile</i> (1)	99%	Sem identificação (1)	<1,7

Tabela 10 - Isolados Não-*Corynebacterium* spp. identificados por sequenciamento de genes 16S rRNA versus MALDI/TOF-MS.

Sequenciamento de genes 16SrRNA Isolados (n)	Similaridade rRNA	MALDI/TOF-MS Isolados (n)	Escore MALDI
<i>Arthrobacter globiformis</i> (2)	100%	<i>Arthrobacter globiformis</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
		<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> (1)	99%	<i>Arthrobacter oxydans</i> (1)	>2,0
<i>Arthrobacter</i> spp. (2)	99%	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> (1)	>2,0
		<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (3)	99%	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> (1)	>2,0
		<i>Corynebacterium bovis</i> (2)	>2,0
<i>Bacillus</i> spp. (1)	>99%	<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
<i>Brachybacterium phenoliresistens</i> * (1)	99%	<i>Arthrobacter mysorens</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Brevibacillus laterosporus</i> (3)	99%	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
		<i>Corynebacterium bovis</i> (2)	>2,0
<i>Brevibacterium otitidis</i> * (3)	99%	<i>Curtobacterium luteum</i> (2)	Entre 1,7 e 1,99
		<i>Arthrobacter ramosus</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Brevibacterium</i> spp. (1)	99%	<i>Curtobacterium luteum</i> (1)	Entre 1,7 a 1,99
<i>Curtobacterium</i> spp. (1)	99%	<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
<i>Dietzia</i> spp. (1)	99%	<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
<i>Gordonia</i> spp. (1)	99%	<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Isoptericola</i> spp.* (5)	>99%	<i>Corynebacterium bovis</i> (1)	>2,0
		Sem identificação (4)	<1,7
<i>Isoptericola variabilis</i> * (2)	100%	<i>Curtobacterium luteum</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
		Sem identificação (1)	<1,7
<i>Microbacterium</i> spp. (1)	100%	<i>Corynebacterium amycolatum</i> (1)	Entre 1,7 e 1,99
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (3)	99%	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (3)	>2,0

*Cepas inexistentes no banco de dados do Software Biotyper3.0.

Figura 2. Eletroferograma que sugere a presença de mais de uma espécie de *Corynebacterium* spp.

As amostras submetidas ao SeqGEN (n=260) foram submetidas a identificação pela MALDI/TOF-MS (Tabela 11). Um total de 94,24% (n=245) foi identificado pela MALDI/TOF-MS com escore $\geq 1,7$, e 5,76% (n=15) não foram identificadas devido ao escore ter sido menor do que 1,7. Para as amostras com escore $>2,0$, o software Biotyper 3.0 não sugeriu outro patógeno como segunda opção.

Tabela 11 - Frequência de identificação bacteriana por MALDI/TOF-MS em amostras de leite de quartos mamários

Micro-organismos	Nível de identificação*	
	Identificação por gênero (entre 1.7 e 1.99)	Identificação espécie-específica ($>2,0$)
<i>Corynebacterium</i> spp.	222	206
<i>Curtobacterium luteum</i>	6	1
<i>Paenibacillus</i> spp.**	6	5
<i>Arthrobacter</i> spp.**	6	3
<i>Bacillus</i> spp.**	2	1
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	1
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	1	-
Total	260***	217

*Algoritmo (1 a 3) lançado pelo software Biotyper 3.0. **Espécies descritas na tabela 10 e 11.***15 amostras tiveram escore $< 1,7$.

Das 39 amostras não identificadas pelo SeqGEN, a MALDI/TOF-MS identificou 38 amostras: 34 *Corynebacterium bovis* e 1 *Corynebacterium* spp. com escore $>2,0$; 2 *Corynebacterium bovis*, 1 *Corynebacterium auriscanis* com escore entre 1,7 e 1,99; e uma amostra sem identificação (escore $<1,7$). Adicionalmente, dentre as amostras excluídas do SeqGEN, 10 foram sugestivas de *Corynebacterium* spp. com baixa similaridade a uma sequência referência (entre 85 e 97%), estas amostras foram identificadas como *Corynebacterium bovis* pela MALDI/TOF-MS com escore $>2,0$.

Dos cinco por cento do total (n=15) que não foram identificados pela MALDI/TOF-MS, o SeqGEN identificou 80% das cepas (12/15), sendo 6 *Corynebacterium bovis*, 1 *Corynebacterium variabile*, 3 *Isoptericola* spp., 2 *Isoptericola variabilis*. Entretanto, não constam no banco de dados do software Biotyper 3.0 os espectros das seguintes bactérias: *Brachybacterium phenoliresistens*, *Brevibacterium otitidis*, *Isoptericola* spp. e *Isoptericola variabilis*; os quais foram o principal motivo de identificação errônea de quatro amostras e de sete amostras sem identificação.

Quanto ao escore de identificação emitido pelo software Biotyper 3.0, a metodologia de extração em tubo com ácido fórmico/acetonitrila foi eficaz para identificação de 222 cepas de *Corynebacterium* spp. provenientes de quartos mamários. Deste total, 4 (1,8%) não apresentaram identificação espécie-específica (*Corynebacterium* spp.). Das 218 cepas de *Corynebacterium* identificadas pela MALDI/TOF-MS, 208 (93,67%) foram lipofílicos e 10 (4,5%) foram não lipofílicos.

Do total de cepas de *Corynebacterium* identificados pela MALDI/TOF-MS, 92,8% (206/222) apresentaram identificação do gênero com provável identificação da espécie e 7,2% (16/222) apresentaram provável identificação do gênero (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência de distribuição de *Corynebacterium* spp. identificados por MALDI/TOF-MS

Micro-organismos	Nível de identificação*	
	Identificação por gênero (entre 1.7 e 1.99)**	Identificação espécie-específica (>2,0)
<i>C. bovis</i>	208	199
<i>C. auriscanis</i>	3	-
<i>C. xerosis</i>	3	3
<i>C. amycolatum</i>	1	-
<i>C. casei</i>	1	1
<i>C. efficiens</i>	1	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	1	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	4	3
Total	222***	206

*Algoritmo (1 a 3) lançado pelo software Biotyper 3.0. **Segundo (Theel et al., 2012) escores acima de 1,7 já são suficientes para identificação de espécies de *Corynebacterium* ***5 destas amostras tiveram escore > 1,9.

Foi observado percentual menor de identificação de *Corynebacterium* spp. por SeqGEN (86%), em relação a MALDI/TOF-MS (90,6%). Do total de *Corynebacterium* spp. identificados pelo SeqGEN, os resultados da MALDI/TOF-MS foram 100% similares para *Corynebacterium auriscanis*, *Corynebacterium casei* e *Corynebacterium efficiens*; 92,63% (176/190) para *Corynebacterium bovis*; e 80% (4/5) para *Corynebacterium xerosis*. Três das quatro cepas identificadas como *Corynebacterium* spp. pela MALDI/TOF-MS foram identificadas pelo SeqGEN como: 2 *Corynebacterium aquilae* e 1 *Corynebacterium amycolatum*.

Alguns isolados corineformes (n=13) foram identificados por meio do SeqGEN apenas em nível de gênero com maior do que 98% de similaridade a alguma sequência referência (tabela 10).

Houve equivalência de diagnóstico de *Corynebacterium* spp. entre a MALDI/TOF-MS e o SeqGEN em 95% (173/183), ao serem excluídas 10 amostras que apresentaram identificação errônea e outras 7 em que não houve identificação. Divergência no diagnóstico de *Corynebacterium* spp. foi observado em 5% (10/183) quando considerados apenas os isolados de *Corynebacterim* spp. A técnica MALDI/TOF-MS apresentou sensibilidade de identificação de *Corynebacterium* spp. de 91,57% quando comparada a técnica de identificação de SeqGEN.

3.4 Discussão

No presente estudo, não houve diferença significativa ($P < 0,005$) entre as duas metodologias de identificação ao ser considerada apenas as amostras identificadas como *Corynebacterium* spp. O fato de ter sido selecionada apenas amostras positivas de *Corynebacterium* identificadas pelos dois métodos para os cálculos estatísticos é fundamentado no delineamento do estudo.

Não existem métodos simples para identificação das espécies dentro do gênero *Corynebacterium*. Vários métodos têm sido sugeridos para identificação das espécies de *Corynebacterium*, os quais incluem a cultura microbiológica baseado em características fenotípicas (HOMMEZ et al., 1999), painéis comerciais (API *Coryne* system, Biolog System) (FUNKE; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998; FRENEY et al., 1991), cromatografia líquido-gasosa (GLC), PCR seguida de restrição enzimática ou sequenciamento de genes 16S rRNA ou *rpoB* (FRENEY et al., 1991; VANEECHOUTTE et al., 1995; FUNKE; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998; HOMMEZ et al., 1999; WATTS et al., 2000; CETINKAYA et al., 2002; HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004; VILA et al., 2012).

Os painéis comerciais foram desenvolvidos para identificação de cepas oriundas de casos clínicos humanos, e apresentam percentual baixo de diagnóstico espécie-específico em relação ao sequenciamento de genes 16S rRNA (WATTS et al., 2000). Portanto os painéis comerciais não apresentam desempenho satisfatório para identificação das espécies de *Corynebacterium*. Ao contrário do sequenciamento de genes e da GLC que são métodos sensíveis para identificação das espécies de *Corynebacterium*, entretanto, são laboriosos e

demorados, de alto custo e principalmente não se adaptam a uma rotina prática de diagnóstico laboratorial.

No presente estudo, 14% dos isolados identificados como *Corynebacterium* spp. por meio de cultura microbiológica apresentaram resultados diferentes ao serem comparados aos do SeqGEN. Existe possibilidade de até 30% de erro pela identificação fenotípica das *Corynebacterium* spp. (COYLE; LIPSKY, 1990; WATTS et al., 2000). O erro de identificação encontrado é devido a características fenotípicas similares entre cepas, de mesma ordem ou família. Dos 14% de Corineformes (não *Corynebacterium* spp.) identificados pelo SeqGEN, 9,5% pertencem à mesma ordem das cepas de *Corynebacterium* (Actinomycetales); 4,5% pertencem a ordem firmicutes que apresentam bastonetes similares de difícil diferenciação pela microscopia óptica. Adicionalmente, foi observado baixo percentual de contaminação na primeira e segunda etapa de isolamento (1,29% e 1,4%). Estes percentuais foram menores ao descrito (3%) por Wilson, Gonzalez e Das (1997).

No presente estudo, do total de 2.382 culturas microbiológicas, 1.242 foram provenientes de isolamento de amostras compostas com prevalência de *Corynebacterium* spp. de 22,90%. Este percentual é similar a prevalência (21,88%) descrita por Barkema et al. (1997). Os patógenos causadores de mastite mais prevalentes foram os secundários com 41%, o que é similar aos resultados descritos em outros estudos (BARKEMA et al., 1997; SCHEPERS et al., 1997; BENITES; MELVILLE; COSTA, 2003; HALTIA et al., 2006; SCHUKKEN et al., 2009; SUPRÉ et al., 2011). Brito et al. (1999a) e Souto et al. (2008), em isolamento de quartos mamários de vacas de leite no Brasil, também relataram maior prevalência de *Corynebacterium* spp. (55,2% e 11,24%), respectivamente. Estudo de prevalência baseado em amostras compostas descreveu *Staphylococcus* spp. como o micro-organismo mais prevalente (11,3%) (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997). No presente estudo, o mesmo pode ser observado se considerado *Staphylococcus* em nível de gênero (33,9%). A prevalência de *Corynebacterium* spp. nas amostras por quartos mamários foi superior as amostras compostas, devido a seleção de vacas infectadas pelo agente na segunda etapa.

Ambas as técnicas avaliadas no presente estudo (SeqGEN e MALDI/TOF-MS) apresentaram maiores frequências de identificação de cepas lipofílicas de *Corynebacterium*. Logo, a alta prevalência do *C. bovis* dentre as demais espécies de *Corynebacterium*, 92,63% pelo SeqGEN e 93,6% pela MALDI/TOF-MS, indica que este patógeno é a espécie mais prevalente de *Corynebacterium* em amostras de leite com infecção intramamária. Este

resultado é similar aos descritos em outros estudos (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004; HUXLEY; GREEN; BRADLEY, 2003; WATTS et al., 2000).

Dentre as espécies não-lipofílicas de *Corynebacterium*, *C. amycolatum* e *C. xerosis* foram os mais frequentes (3,7%). Watts et al. (2000) detectaram maior prevalência (17,24%) de *C. amycolatum* dentre as espécies de *Corynebacterium* isoladas da glândula mamária bovina, resultado similar ao de Hommez et al. (1999). Por outro lado, houve baixo percentual de identificação de *C. xerosis* (4,97%) isolados da glândula mamária (WATTS et al., 2000). Não foram encontrados estudos sobre características de patogenicidade à glândula mamária ou aspecto zoonótico de *C. xerosis* e *C. amycolatum*. Estudos de isolamento de *C. xerosis* de diferentes amostras clínicas veterinárias apresentaram estreita relação com as espécies *C. amycolatum*, *C. freneyi*, e *C. hansenii*, sendo necessária a combinação de técnicas, fenotípicas e moleculares, para identificação espécie-específica (PALACIOS et al., 2010)

Quanto ao escore de identificação emitido pelo software Biotyper 3.0, a extração em tubo por ácido fórmico/acetonitrila apresentou alta sensibilidade (91,57%) para identificação das cepas de *Corynebacterium* spp., uma vez que 95% dos isolados apresentaram escores $\geq 1,7$. Este percentual foi superior ao encontrado por Theet al. (2012), que ao comparar metodologias de extração para identificação por MALDI/TOF-MS, relataram 88,5% de amostras com escore $\geq 1,7$; porém descreveram maior percentual de identificação com o uso do método de extração direto em placa (escore $> 1,5$). Por outro lado, a necessidade de utilizar a extração em tubo para bactérias do gênero *Corynebacterium*, com o objetivo de aumentar os escores de identificação por MALDI/TOF-MS foi relatado por Alatoom et al. (2012).

No presente estudo, amostras (n=15; 5%) que não foram identificadas pela MALDI/TOF-MS apresentaram escores $< 1,7$. Algumas possíveis causas da não identificação: a) amostras apresentaram excelentes espectros para padrão de identificação, o que demonstra o sucesso na extração de proteínas ribossomais, porém os espectros encontrados não se equivalem aos do banco de dados do software Biotyper 3.0; e b) ter isolado mais de um agente da glândula mamária, o que acontece em casos de infecção mista, ou contaminação, com formação de espectros provavelmente devido à extração de proteínas dos dois patógenos. Percentual maior de amostras com escore $< 1,7$ (11,5%) foram relatados por Theel et al. (2012).

O uso de MALDI/TOF-MS permitiu a identificação de amostras que não foram identificadas pela SeqGEN (n= 38). O diagnóstico destas amostras não foram concluídos pelo SeqGEN devido à amplificação de curtas sequências, que proporcionaram baixo percentual de

similaridade as sequências referência; e também, ao conjunto de primer específico utilizado para identificação das espécies de *Corynebacterium*.

Das amostras não identificadas pelo SeqGEN (n= 38), algumas (n=18) que apresentaram mais de uma sequência no eletroferograma. Isto pode ter ocorrido pela possibilidade de haver mais de uma espécie de *Corynebacterium* na mesma amostra, as quais não seriam diferenciadas por métodos fenotíficos. Esta hipótese é fundamentada nos resultados descritos por Bexiga et al. (2011) que *Corynebacterium* spp. é comensal e apenas coloniza o canal do teto, e nos resultados de Benites, Melville e Costa (2003) que descreveram a presença deste gênero de bactérias relacionadas à mastite em partes altas da glândula mamária. De fato, isto torna provável a existência na mesma amostra de espécies ou subtipos que apenas colonizam o canal do teto, e outras que seriam responsáveis pelas moderadas CCS em regiões mais altas da glândula mamária.

Dos 351 isolados de *Corynebacterium* spp. que foram recultivados para identificação por meio do SeqGEN; 25 amostras foram consideradas contaminadas por apresentarem mais de um micro-organismo. Algumas possíveis causas da contaminação: a) contaminação no momento de recultivo; b) infecção intramária mista. Percentuais de infecção mista de *Corynebacterium* spp. com patógenos primários (2,02% de *Staphylococcus* + *Corynebacterium* spp.; 1,35% de *Streptococcus* spp. + *Corynebacterium* spp.; e 0,15% de *Staphylococcus* + *Streptococcus* spp.+ *Corynebacterium* spp.) foram descritos por Souto et al. (2010).

No presente estudo, o SeqGEN identificou espécies de corineformes em 31 amostras (14%). Estes isolados corineformes foram estudados filogeneticamente, e possuem semelhanças quimiotaxonômicas relacionadas às *Corynebacterium* spp. (PASCUAL et al., 1995). O SeqGEN identificou isolados bacterianos (n=11), que não estão incluídos no banco de dados do software de identificação Biotyper 3.0 do MALDI/TOF-MS, os quais, não foram identificados (n=5) e foram identificados erroneamente (n=6) pela MALDI/TOF-MS.

O SeqGEN é reconhecido como uma técnica referência (*gold standard*) por diferenciar espécies estritamente relacionadas (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004). Dentre as vantagens da MALDI/TOF-MS em relação ao SeqGEN, destacam-se a rapidez na conclusão de diagnósticos por análise realizada. Porém, esta técnica ainda depende, em alguns casos, do uso do SeqGEN para validação de diagnósticos espécie-específicos. Entretanto, o SeqGEN é laborioso e tem elevado custo por análise. Além disso, amostras que apresentam IIM mista necessitam de *primer* específicos para cada micro-organismo presente na amostra. Por

exemplo, para uma amostra que apresente *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp., se o primer escolhido for restrito para diferenciação de espécies de *Corynebacterium*, haveria amplificação da região alvo apenas para *Corynebacterium* spp, e consequentemente, apenas *Corynebacterium* spp. seria detectado na amostra.

No presente estudo, algumas limitações foram observadas, o que reduziu o percentual de identificação da MALDI/TOF-MS. Algumas limitações observadas: a) foi detectada acima do esperado, frequência de diversas cepas (14%) da ordem actinomycetales, algumas destas apenas foram identificadas em nível de gênero (Tabela 10). Isto foi devido à escolha do primeiro par de primer específico para cepas de *Corynebacterium* lipofílicas, logo não houve um desenho de primer que abrangesse possíveis cepas de mesma ordem; b) não foram identificadas algumas amostras pelo SeqGEN (15%) em função da falta de amplificação ou por apresentarem curtas sequências. O sequenciamento do gene 16S rRNA apresenta limitações na identificação de algumas espécies de corineformes quando não for sequenciado número ideal de pares de bases (1.500) (KONRAD et al., 2010; ALATOOM et al., 2012; VILA et al., 2012); c) outra possibilidade limitante pode estar associada ao fato de não ter sido encontrada neste estudo alguma cepa de *Corynebacterium ulcerans*, visto existência de condições específicas de cultivo para esta espécie (SUVAJDZIC et al., 2012), procedimento este que não foi realizado no presente estudo.

O diagnóstico da mastite precisa cada vez mais de técnicas rápidas, de baixo custo e eficazes, uma vez que está diretamente relacionado às consequências provenientes da infecção intramamária. A MALDI/TOF-MS é uma técnica rápida, que despende 12 minutos por amostra diagnosticada (BARREIRO et al., 2010). Nossos resultados foram similares aos de Konrad et al. (2010), Theel et al. (2012), Vila et al. (2012) e Alatoom et al. (2012) os quais descreveram que *Corynebacterium* spp. é corretamente identificado pela MALDI/TOF-MS. Entretanto, os resultados do presente estudo diferem, quanto aos valores de corte para score, dos descritos por Theel et al. (2012), que relataram provável identificação de gênero de *Corynebacterium* spp. para escores $\geq 1,5$; e foram similares aos de Vila et al. (2012), Alatoom et al. (2012) e Konrad et al. (2010) que descreveram a necessidade de se respeitar os pontos de corte de escores recomendados pela Bruker Daltonis.

3.5 Conclusão

Houve equivalência de resultados de 95% entre as duas técnicas de identificação utilizadas. A técnica de MALDI/TOF-MS com o uso da extração em tubo por ácido fórmico/acetonitrila foi aplicada com 91,57% de sensibilidade de identificação das espécies de *Corynebacterium* nos casos de mastite bovina subclínica, quando comparado aos resultados do sequenciamento de genes 16S rRNA.

4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE EM VACAS COM MASTITE CAUSADA POR *Corynebacterium* spp.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram (1) avaliar o efeito de infecções intramamárias (IIMs) subclínicas causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários bovinos; e (2) determinar o efeito de IIMs causadas por *Corynebacterium* spp. sobre o teor de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total, extrato seco desengordurado do leite e contagem de células somáticas (CCS). No total, 1.242 vacas em lactação de 21 rebanhos foram amostradas. Inicialmente, amostras compostas foram coletadas para identificação das vacas infectadas por *Corynebacterium* spp. Em seguida, em um prazo inferior a 15 dias, amostras de leite de quartos mamários das vacas selecionadas (n=285) foram coletadas para isolamento microbiológico. As vacas com isolamento de *Corynebacterium* spp. foram submetidas à ordenha individual de todos os quartos, por meio de equipamento de ordenha. Após ordenha foi mensurada a produção por quartos e feita a coleta de amostras de leite para análises de composição e CCS. Os quartos mamários foram considerados as unidades experimentais e a CCS foi transformada em função logarítmica na base 10. Resultados de produção, composição e CCS de quartos mamários infectados por *Corynebacterium bovis* foram comparados aos de quartos contralaterais negativos por meio de delineamento estatístico *strip-plot*. As cepas identificadas como *Corynebacterium* spp. pela cultura microbiológica foram submetidas a identificação por meio do sequenciamento de genes 16S rRNA (SeqGEN). Um total de 190 quartos mamários foram identificados infectados por *Corynebacterium* spp. pelo SeqGEN, os quais apresentaram média de CCS de 690×10^3 células/mL. Destes, foram selecionados 46 pares de quartos mamários contralaterais com e sem IIM causada por *Corynebacterium* spp. A CCS média dos quartos sem IIM foi menor (81×10^3 células/mL) em relação aos quartos infectados (194×10^3 células/mL). Em conclusão, houve efeito de IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre a CCS. Não houve efeito de IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre a produção de leite, gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado.

Palavras-chave: Produção. Composição. Mastite subclínica. *Corynebacterium* spp.

ABSTRACT

The objectives of this study were (1) to evaluate the effect of subclinical intramammary infections (IMI) caused by *Corynebacterium* spp. on milk yield and composition in mammary quarters, and (2) to determine the effect of IMI caused by *Corynebacterium* spp. on the concentration of fat, protein, lactose, casein, total solids, non fat dry milk and somatic cell count (SCC). A total of 1242 lactating cows from 21 herds were sampled. Initially, samples were collected for identification of cows infected by *Corynebacterium* spp. Then, in a period less than 15 days, samples of milk from mammary quarters of selected cows (n = 285) were collected for microbiological isolation. Cows with *Corynebacterium* spp. were submitted to milking from all quarters individually through milking equipment. After milking the quarters was measured and milk was sampled for analysis of composition and CCS. The mammary glands were considered experimental units and CCS was transformed into base-10 logarithmic function. Results of milk yield and composition and CCS of mammary quarters infected with *Corynebacterium bovis* were compared with contralateral negative by *strip-plot* statistical design. The strains identified as *Corynebacterium* spp. by the microbiological culture were submitted to identification by sequencing of 16S rRNA (SeqGEN). A total of 190 mammary quarters were identified infected with *Corynebacterium* spp. by SeqGEN, which had an average SCC of 690×10^3 cells/mL. Of these, 46 pairs of contralateral mammary glands were selected with and without IMI caused by *Corynebacterium* spp. The average of CCS without IMI (81×10^3 cells/mL) was lower than compared to infected quarters (194×10^3 cells/mL). In conclusion, IMI caused by *Corynebacterium* spp. had effect on CCS. There was no effect of IMI caused by *Corynebacterium* spp. on milk yield and on the concentration of fat, protein, casein, lactose, total solids and solids not fat.

Key words: Production. Composition. Subclinical mastitis. *Corynebacterium* spp.

4.1 Introdução

A mastite é a enfermidade mais onerosa da produção leiteira bovina (HALASA, 2007), cuja causa mais comum são infecções subclínicas causadas por bactérias (DJABRI et al., 2002; PHILPOTT; NICKERSON, 2002). A intensidade da resposta imune na glândula mamária frente à infecção depende do agente causador (LE ROUX; LAURENT;

MOUSSAOUI, 2003) e do grau em que este coloniza a glândula (COSTA; BENITES; MELVILLE, 1995). Logo, informações acerca da prevalência de patógenos causadores e dos custos da mastite são de interesse da cadeia agroindustrial leiteira (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997). Tais custos estão associados às perdas de produção de leite, principalmente causados pela mastite subclínica (ANDERSEN et al., 2010), que acometem aproximadamente 50% dos animais (PITKÄLÄ et al., 2004).

A importância da mastite subclínica se deve a deterioração da qualidade de leite, aumento da CCS e redução de produção, sem apresentação de sinais clínicos (FORSBÄCK et al., 2009). As perdas ocorrem por danos causados pelos micro-organismos aos epitélios secretores de leite da glândula e ao enfraquecimento das junções celulares (AULDIST et al., 1995) e além disso, estes danos podem resultar na perda permanente da capacidade de síntese. Por outro lado, a indústria laticinista requer o aumento da produção de leite de qualidade para que se alcance maior rendimento de produtos derivados lácteos (FORSBÄCK et al., 2010b).

Considerando que os agentes principais da mastite têm sido mais bem controlados em decorrência de programas específicos de controle e prevenção, os agentes secundários têm chamado atenção e se tornado objeto de estudos nos principais países produtores de leite (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). *Corynebacterium* spp. são considerados agentes secundários da mastite e normalmente causam infecções subclínicas com aumento moderado na contagem de células somáticas (CCS) (BRADLEY; GREEN, 2005; SCHUKKEN et al., 2009). A alta prevalência destes agentes em rebanhos leiteiros tem despertado o interesse em práticas de controle e tratamento, principalmente em rebanhos de CCS moderada.

Os resultados do efeito de IIM causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a saúde da glândula mamária são ainda inconclusivos. Existem evidências de que *C. bovis* ao infectar quartos mamários apresentem função de barreira biológica contra patógenos primários da mastite (*S. aureus* e *Streptococcus* spp.) por meio de colonização do canal e cisterna do teto (RAINARD; POUTREL, 1982; SORDILLO et al. 1989; SCHUKKEN et al., 2003). Outros resultados sugerem que quartos com IIM causada por *C. bovis* são mais predispostos à infecção causada por estreptococos ambientais, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Entretanto, existe tendência de considerar *Corynebacterium* spp. como de menor relevância por desencadear resposta inflamatória de baixa intensidade (LEVAN; BERTHART; ESLER, 1985). *Corynebacterium bovis* foi relatado como causa importante da mastite bovina e com redução na produção de leite (METTIFOGO et al., 1991; GRÖHN et al., 2004; VICTÓRIA et al.,

2005). Por outro lado, estes micro-organismos apresentam impacto limitado na produção e qualidade do leite (LEVAN; BERHART; ESLER, 1985; SCHUKKEN et al., 2009).

Poucos estudos determinaram a relação entre o agente causador da infecção subclínica e os seus efeitos sobre a produção e a composição do leite (LEITNER et al., 2006). Assim, avaliar o efeito de IIM causadas por *Corynebacterium* spp. pode ajudar a entender a relação entre este patógeno e os seus efeitos sobre as variáveis de produção, composição, e CCS. Entretanto, para avaliação destes efeitos é necessário metodologia de ordenha que minimizem fontes de variação, como por exemplo, o momento da amostragem durante a ordenha que pode influenciar a concentração de gordura. LeVAN, Berhart e Esler (1985) descreveram a possibilidade de utilizar quartos sadios (controle) em comparação a quartos infectados por *Corynebacterium* spp. para avaliação dos teores de gordura e proteína. No entanto, esta técnica pode ser mais bem empregada com o uso de equipamento para coleta de todo o leite produzido por quartos mamários separadamente (FORSBÄCK et al., 2010b). A importância de se coletar todo o leite para realização de análises composicionais foi relatada por Urech, Puhan e Schällibaum (1999) ao testar diferentes métodos de amostragem.

A maioria dos estudos avaliou o efeito de IIM por *Corynebacterium* spp. em nível de grupo ou gênero, no entanto, poucos avaliaram o efeito do *Corynebacterium* spp. em nível de espécie sobre a produção e composição do leite. Isto é devido a inexistência de métodos simples para identificação das espécies de *Corynebacterium* spp., e também, aos altos percentuais de erros de identificação destas espécies (30%) pela metodologia convencional (COYLE; LIPSKY, 1990; WATTS et al., 2000). No entanto, o sequenciamento do gene 16Sr RNA é uma metodologia eficaz de identificação das espécies de *Corynebacterium* isoladas do leite bovino (WATTS et al., 2000).

Portanto, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar o efeito de IIMs subclínicas causadas por *Corynebacterium* spp. sobre a composição e a produção de leite de quartos mamários bovinos; e (2) determinar o efeito da IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre o teor de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total, extrato seco desengordurado do leite e contagem de células somáticas (CCS).

4.2 Materiais e métodos

Seleção de rebanhos e de vacas

No total, 1.242 vacas em lactação de 21 rebanhos leiteiros da região de Pirassununga, São Paulo, Brasil, foram selecionadas com base na proximidade do laboratório. Todas as fazendas selecionadas utilizavam ordenha mecânica e manejo de ordenha com as seguintes práticas de controle de mastite: descarte dos primeiros jatos para verificação de mastite clínica, pré-dipping e secagem dos tetos com toalhas descartáveis, seguido de pós-dipping ao final da ordenha. Todos os rebanhos utilizaram a terapia da vaca seca e tratamento de mastite clínica. Todas as amostragens de leite foram realizadas na segunda ordenha do dia de coleta. As coletas de amostras foram realizadas em duas etapas: a primeira foi realizada por coleta de amostras compostas de leite de todas as vacas em lactação (n=1.242), para isolamento das vacas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. Na segunda, em um prazo inferior a 15 dias, amostras de leite de quartos mamários das vacas com isolamento de *Corynebacterium* spp. em amostras compostas (n=285) foram coletadas para isolamento microbiológico. As vacas com isolamento de *Corynebacterium* spp. em quartos mamários foram submetidas à ordenha individual dos quartos com o uso de equipamento desenvolvido para este fim (Figura 3). Antes da ordenha os tetos foram imersos em solução de iodo 0,5%, e decorridos 30 segundos, foram secos com papel-toalha descartável. Em seguida, foram desprezados os três primeiros jatos em caneca de fundo preto para diagnóstico de mastite clínica. Os quartos mamários foram ordenhados separadamente por meio de um equipamento de balde ao pé (Intermaq Sistemas de Ordenha, Porto Alegre, Brasil) acoplado à linha de vácuo do sistema de ordenha mecanizada. O equipamento foi composto por pulsador próprio e um conjunto de quatro teteiras individuais conectadas a mangueiras de silicone com válvulas de liberação de vácuo. Este sistema permitiu a canalização do leite de cada quarto mamário até recipientes separados em um latão de aço inoxidável. Do total de leite ordenhado, mensurações da produção por quarto mamário produziu em mililitros foram realizadas, e após homogeneização do leite, amostras representativas de leite (40 mL) foram coletadas em tubos plásticos, totalizando quatro amostras por vaca. As amostras de leite foram conservadas com bronopol na proporção recomendada pelo fabricante (Microtabs II, D & F Control Systems, Inc., Norwood, MA, EUA), e resfriadas a 5°C até as análises de composição e CCS.

Para cálculo de produção de leite, obtidos em mililitros (mL), os dados foram convertidos em gramas por meio da fórmula de Fleishmann (PEREIRA et al., 2001) e ajustados para o percentual relativo de gordura 3,5% (SKLAN; ASHKENAZI; BRUN, 1992). Onde a fórmula de Fleishmann é definida como:

$$ES\% = 1,2G + 2,655[(100D-100)/D]$$

Onde: ES% = % de extrato seco; G = % de gordura; D = densidade a 15°C. Para obter o extrato seco desengordurado (ESD), basta subtrair o extrato seco (ES) do percentual de gordura (G), (ESD = ES - G). Para compor os dados de produção de leite, os valores relativos (%) de gordura e proteína foram convertidos em gramas (g).

Figura 3 - Fluxo de coleta de amostras compostas e por quartos mamários para isolamento, composição e CCS.

Definição de infecção intramamária (IIM)

Os quartos mamários bovinos foram considerados infectados quando as amostras de leite apresentavam: (a) isolamento de micro-organismo pela cultura microbiológica com pelo menos 10 colônias (1,000 cfu/mL); e, (b) duas confirmações consecutivas do micro-organismo, em prazo inferior a 15 dias, sendo um isolamento baseado em amostra composta de leite e outro em amostra por quarto mamário (ANDERSEN et al., 2010; DOHOO et al., 2011a, b). Por outro lado, as amostras de leite foram diagnosticadas como negativas quando não apresentaram isolamento de micro-organismos (em até 72 horas de incubação) nas duas

etapas de amostragem e com valores inferiores 200×10^3 células/mL de CCS realizada por meio de mensuração indireta.

O isolamento bacteriano e a identificação pelo sequenciamento de genes 16S rRNA foram realizados de acordo ao descrito no item 3.2.

Metodologia de análise de composição do leite e contagem de células somáticas (CCS)

A concentração de gordura, proteína bruta, lactose, caseína, extrato seco total e extrato seco desengordurado foram analisados por absorção infravermelha, utilizando-se equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN EUA). A CCS foi realizada por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico (International Organization for Standardization & Dairy Federation, International Standard – ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:2006), utilizando-se equipamento Somacount 300® (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN EUA). Os resultados de CCS foram expressos em células somáticas por mililitro de leite (CS/mL).

Análise estatística

Quartos mamários foram considerados as unidades experimentais. Todos os modelos estatísticos foram analisados usando PROC MIXED do SAS® versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Dois conjuntos de dados foram utilizados para a análise estatística:

(1) Para o primeiro foi utilizado delineamento em blocos casualizado para dados pareados, nos quais foram considerados todos os quartos mamários infectados por *Corynebacterium* spp. e quartos negativos (não-contralaterais). As fazendas e o efeito de metade do úbere (quartos anteriores e posteriores) foram blocados com o objetivo de minimizar a heterogeneidade entre as unidades experimentais.

(2) Para o segundo foi utilizado delineamento em parcelas subdivididas em faixas (*strip-plot*) para os quartos contralaterais, em que os quartos anteriores e posteriores foram separados em metades, de modo que as glândulas contralaterais esquerda e direita foram

comparadas dentro de uma mesma metade e dentro de uma mesma vaca, utilizando-se o seguinte modelo misto (SILVA et al., 2008):

$$Y = \mu + \text{IIM} + \text{metade} + \text{IIM} * \text{metade} + [\text{vaca} + \text{vaca} * \text{metade} + \text{IIM} * \text{vaca}(\text{metade})] + e$$

Onde Y é a variável dependente em estudo; μ é a média da variável em questão; IIM e Metade são os fatores fixos de variação, onde: IIM é a presença ou não de IIM causada por subclínica pelo *Corynebacterium* spp.; e a Metade são os tetos contralaterais anteriores ou posteriores, dentro de uma mesma vaca; IIM*Metade é a interação entre os fatores fixos de variação; Vaca é o fator de variação aleatório, e e é o erro aleatório atribuído aos fatores de variação.

Para remover a heterogeneidade de variâncias, os dados de CCS obtidos foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 ($\log_{10}\text{CS/mL}$) para análise estatística, e à função antilogarítmica (CS/mL) para discussão dos resultados.

4.3 Resultados

Prevalência de IIM

Para seleção dos animais do presente estudo, foram coletadas amostras compostas de leite (n=1.242) para identificar vacas com IIM causada por *Corynebacterium* spp. Com base nos resultados de amostras compostas, os micro-organismos mais prevalentes foram *Corynebacterium* spp. (n=285; 22,9%); *Staphylococcus* coagulase negativa (n=224; 18%); *Staphylococcus* coagulase positiva (n=197; 15,8%); *Streptococcus* spp. (n=193; 15,9%); *Arcanobacterium pyogenes* (n=18; 1,4%); 21,25% (n=264) não apresentaram crescimento e 1,29% (n=16) foram excluídas por contaminação.

Dentre o conjunto de vacas com isolamento de *Corynebacterium* spp. (n=285) foram realizadas em prazo inferior a 15 dias coletas de leite de todos os quartos mamários (n=1.140) para cultura microbiológica, análises de composição e CCS. Do total de amostras coletadas por quartos mamários, *Corynebacterium* spp. foi isolado mais prevalente (n=351; 30,76%), *Staphylococcus* coagulase negativa (n=141; 12,3%); *Staphylococcus* coagulase positiva (n=73; 6,4%); *Streptococcus* spp. (n=68; 5,9%); *Arcanobacterium pyogenes* (n=16; 1,45%);

38,9% (n=444) não apresentaram crescimento e 1,4% (n=16) foram excluídas por contaminação. Os patógenos secundários corresponderam a 70,6% das amostras por quartos mamários.

O sequenciamento de genes 16S rRNA foi realizado para identificação espécie-específica dos isolados de *Corynebacterium* spp. Das amostras submetidas ao SeqGEN (n=260), foram excluídas 15% (n=39), das quais 10,8% (n=28) foram devido à baixa similaridade (<98%) com as sequências referência dos bancos de dados do NCBI, e 4,2% (n=11) por não terem apresentado sequência após três tentativas de identificação. O restante de amostras (n=221) apresentou alta similaridade às sequências referência ($\geq 98\%$). Destas, 86% (n=190) foram identificadas como *Corynebacterium* spp., e 14% (n=31) como corineformes.

Do total de isolados identificados pelo SeqGEN como *Corynebacterium* spp., 92,63% (n=176) foram *Corynebacterium bovis* (lipofílicos); e o restante 7,36% (n=14) foram *Corynebacterium* não-lipofílicos. Das espécies não-lipofílicas, 2 amostras foram *C. amycolatum*; 2 *C. aquilae*, 1 *C. xerosis*, 1 *C. auriscanis*, 1 *C. casei*, 1 *C. efficiens*, e 1 *C. variabile*. Para 5 amostras, o sequenciamento não identificou a espécie, sendo uma amostra com >99% de similaridade para *C. auriscanis* ou *C. resistens*, e 4 amostras com >99% de similaridade para *C. xerosis* ou *C. freneyi* ou *C. hansenii*.

Produção e composição considerando todos os quartos mamários infectados por *Corynebacterium* spp.

Considerando o conjunto de dados de todos os quartos mamários, os quartos infectados por *Corynebacterium* spp. no presente estudo apresentaram menor produção em 597g/ordenha/quarto de leite produzido, 19g/ordenha/quarto de gordura, 16 g/ordenha/quarto de proteína, 30g/ordenha/quarto de lactose, 13g/ordenha/quarto de caseína, 72 g/ordenha/quarto de sólidos totais e 52g/ordenha/quarto de extrato seco desengordurado, quando comparados a quartos sadios. Em relação à CCS, quartos com IIM causada por *Corynebacterium* spp. apresentaram CCS de $662,37 \times 10^3$ céls/mL, sendo que 49% dos quartos apresentaram CCS $> 200 \times 10^3$ céls/mL (Tabela 13).

Quanto às espécies, quartos mamários infectados por *Corynebacterium bovis* (n=176) foram comparados a quartos mamários sem IIM (n=200). Os quartos infectados por *C. bovis* produziram 640g de leite a menos do que quartos sadios, e apresentaram CCS de

690x10³ células/mL. Devido a baixa frequência, não foi possível realizar análise estatística entre cada espécie não-lipofílica de *Corynebacterium* e quartos sadios quanto a prováveis alterações das variáveis gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e caseína. Apesar do baixo isolamento de amostras de *C. amycolatum*, *C. aquilae* e *C. variabile*, os quartos infectados apresentaram CCS>800x10³ céls/mL (Tabela 14).

Tabela 13 - Efeito da infecção intramamária causada por *Corynebacterium* spp. sobre a composição e a CCS no leite em nível de quartos mamários não-contralaterais de uma ordenha.

Variável	Quartos mamários					
	<i>n</i> ¹	Infectados	<i>n</i> ¹	Sadios	EPM ²	<i>P</i>
CCS (CS/mL)	190	662,37	200	54,28	49,63	<,0001
CCS (log ₁₀ CS/mL)	190	5,32	200	4,60	0,03	<,0001
Produção de leite (g/ordenha/quarto) ³	190	1623,01	200	2220,25	55,24	<,0001
PLC (g/ordenha/quarto) ⁴	190	1628,97	200	2209,49	54,89	<,0001
Gordura (g/ordenha/quarto)	190	57	200	76	0,002	<,0001
Proteína (g/ordenha/quarto)	190	52	200	68	0,001	<,0001
Lactose (g/ordenha/quarto)	190	73	200	103	0,002	<,0001
Caseína (g/ordenha/quarto)	190	40	200	53	0,001	<,0001
Sólidos totais (g/ordenha/quarto)	190	198	200	270	0,006	<,0001
ESD ⁵ (g/ordenha/quarto)	190	141	200	193	0,004	<,0001

¹*n*: Número de observações. ²EPM: Erro padrão da média. ³Volume de leite, em mililitros, convertido para massa de leite, em gramas. ⁴Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5%. ⁵ESD: Extrato seco desengordurado.

Quartos traseiros, tanto os sadios quanto os infectados, produziram mais leite do que quartos dianteiros. Quartos sadios apresentaram média de CCS=60x10³ céls/mL, e não apresentaram diferença na CCS e na distribuição entre dianteiros e traseiros (Tabela 15).

Produção e composição considerando os quartos mamários contralaterais

Dos quartos mamários com IIM por *Corynebacterium* spp. foram selecionados quartos contralaterais (n=92). Houve efeito de IIM por *Corynebacterium* spp. na LogCCS, (*P*=0,02).

A CCS mensurada em células por mililitro apresentou diferença significativa ($P=0,01$), entre a CCS para os quartos infectados (194×10^3 céls/mL) e sadios (81×10^3 céls/mL). Apesar de diferença significativa, a média da CCS de quartos contralaterais infectados apresentou-se abaixo do limiar padrão para quartos considerados sadios ($<200 \times 10^3$ céls/mL) (DOHOO; LESLIE, 1991). Não houve efeito de *Corynebacterium* spp. sobre a produção de leite, gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado (Tabelas 16).

Tabela 14 - Produção, composição do leite e CCS, por espécies de *Corynebacterium* identificadas pelo sequenciamento de genes 16S rRNA.

Espécies	<i>n</i> ¹	Produção de leite ²	PLC ³	Gordura (%)	Gordura ²	Proteína (%)	Proteína ²	CAS ⁴ (%)	Lactose (%)	ST ⁵ (%)	ESD ⁶ (%)	CCS ⁷
<i>Corynebacterium</i> spp.	190	1623,01	1628,97	3,70	57	3,35	52	2,56	4,37	12,41	8,70	662,37
<i>C. bovis</i> *	176	1573,12	1579,89	3,72	55	3,35	50	2,56	4,35	12,40	8,68	690,44
<i>C. xerosis/freneyi/hansenii</i> *	4	3083,1	2850,69	3,03	93	3,16	96	2,45	4,75	11,93	8,89	81,2
<i>C. amycolatum</i>	2	1215,47	1167,39	3,51	39	3,31	39	2,48	4,39	12,2	8,69	887,5
<i>C. aquilae</i>	2	2407,01	2779,675	4	107	3,52	79	2,72	4,42	12,93	8,93	1014
<i>C. auriscanis</i> *	1	2635,45	2444,71	3,05	80	3,25	85	2,55	4,74	11,96	8,91	33
<i>C. auriscanis / resistens</i>	1	2517,04	2588,47	3,67	92	2,4	60	1,85	4,44	11,47	7,8	57
<i>C. casei</i>	1	627,91	829,40	5,47	34	3,64	22	2,76	4,7	14,87	9,4	199
<i>C. efficiens</i> *	1	1995,57	2207,85	4,15	82	3,71	74	2,89	4,67	13,58	9,43	43
<i>C. variabile</i>	1	2274,88	2513,17	4,14	94	4,3	97	3,23	4,43	13,78	9,64	937
<i>C. xerosis</i> *	1	969,01	935,46	3,32	31	3,39	32	2,60	4,56	12,25	8,92	118,5
Quartos sadios	200	2220,25	2209,49	3,52	76	3,17	68	2,46	4,63	12,29	8,77	54,28

¹*n*: Número de observações. ²Em gramas por odenha por quarto mamário. ³PLC: Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, em gramas por odenha por quarto mamário. ⁴CAS: Caseína. ⁵ST: Sólidos totais. ⁶ESD: Extrato seco desengordurado. ⁷CCS: Contagem de células somáticas (10³ céls/mL). *Espécies de *Corynebacterium* não-lipofílicas encontradas entre os 46 quartos contralaterais infectados.

Tabela 15 - Distribuição de quartos mamários anteriores e posteriores, infectados por *Corynebacterium bovis* e sadios, em relação às médias das variáveis CCS, produção de leite e PLC.

Variáveis	Quartos anteriores		Quartos posteriores		P
	Infectados	Sadios	Infectados	Sadios	
n ¹	87	95	87	105	-
CCS ²	874,18	56,12	506,70	52,6	0,08
Produção de leite ³	1346,92	2044,11	1799,32	2379,61	0,60
PLC ⁴	1364,14	2053,04	1795,65	2351,04	0,59

¹n: Número de observações. ²CCS: Contagem de células somáticas (10³ céls/mL). ³Em gramas por odenha por quarto mamário. ⁴PLC: Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, em gramas por odenha por quarto mamário.

Cinco espécies de *Corynebacterium* não-lipofílicos foram encontradas entre os 46 quartos contralaterais infectados, e totalizaram 11 quartos (23,91%). Estas cepas não-lipofílicas apresentaram CCS média de 254×10^3 céls/mL, a qual foi responsável por um aumento de 31% na média geral de CCS por gênero. A distribuição de espécies não-lipofílicas de *Corynebacterium* pode ser observada na tabela 14.

Dentre os quartos sadios, os traseiros apresentaram menor média de CCS (71×10^3 céls/mL) em relação aos quartos dianteiros (93×10^3 céls/mL). Dentre os quartos sadios dianteiros, os anteriores direitos apresentaram maior média de CCS (116×10^3 céls/mL) em relação aos anteriores esquerdos (61×10^3 céls/mL). Para os quartos infectados, as maiores médias foram observadas para os quartos do lado esquerdo, 244 e 279×10^3 céls/mL, para anteriores e posteriores, respectivamente. Não houve interação entre o efeito de IIM causada por *Corynebacterium* spp. e o efeito de metade (anteriores e posteriores) sobre as variáveis estudadas.

Tabela 16 - Efeito da IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre composição, produção e CCS no leite de quartos mamários contralaterais.

Variável	Quartos mamários				
	n^1	Infectados	Sadios	EPM ²	P
Produção de leite ³ (g/ordenha/quarto)	46	1.868,65	1.901,41	119,39	0,80
PLC ⁴ (g/ordenha/quarto)	46	1.828,92	1.876,37	111,61	0,83
CCS ⁵ (LogCS/mL)	46	4,97	4,74	0,05	0,02
Lactose (%)*	46	4,54	4,58	0,026	0,44
Lactose (g/ordenha/quarto)	46	85	89	0,005	0,74
Gordura (%)*	46	3,45	3,46	0,10	0,95
Gordura (g/ordenha/quarto)	46	62	63	0,003	0,96
Proteína (%)*	46	3,23	3,20	0,04	0,78
Proteína (g/ordenha/quarto)	46	58	69	0,003	0,85
Caseína (%)*	46	2,50	2,48	0,03	0,76
Caseína (g/ordenha/quarto)	46	45	47	0,002	0,77
Sólidos totais (%)*	46	12,19	12,23	0,12	0,91
Sólidos totais (g/ordenha/quarto)	46	225	233	0,01	0,78
ESD ⁶ (%)*	46	8,74	8,76	0,05	0,87
ESD ⁶ (g/ordenha/quarto)	46	162	168	0,01	0,75

¹n: Número de observações. ²EPM: Erro padrão da média. ³Volume de leite, em mililitros, convertido para massa de leite, em gramas. ⁴Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5%. ⁵CCS: Contagem de células somáticas. ⁶ESD: Extrato seco desengordurado. *Porcentagem com base em 100mL de leite.

4.4 Discussão

Prevalência de IIM

Os resultados de isolamento bacteriano das amostras compostas e por quartos mamários apresentaram alta prevalência de micro-organismos isolados do leite bovino, e são similares aos resultados de diversos estudos que encontraram maior prevalência de patógenos secundários causadores de IIM (BARKEMA et al., 1997; SCHEPERS et al., 1997; WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997; BRITO et al., 1999a; HALTIA et al., 2006; SCHUKKEN et al., 2009).

Quanto a distribuição das espécies identificadas, foram observados resultados semelhantes aos de Huxley, Helps e Bradley (2004) e Watts et al. (2000), as quais apresentaram maior prevalência da espécie de *C. bovis* (>75%), em relação às espécies não lipofílicas. Um percentual de amostras foi excluído devido à baixa similaridade de identificação a sequências referência (<98%), e percentual semelhante foi descrito por Mignard e Flandrois et al. (2006), porém diferiu para as cinco amostras de *Corynebacterium* spp., as quais com >98% de similaridade, apresentaram diagnóstico inconclusivo para nível espécie. Isto se deve, provavelmente, pelo fato da reação de sequenciamento ter apresentado curtas sequências, o que impede a diferenciação por perda de regiões alvos.

Produção e composição considerando todos os quartos mamários infectados por *Corynebacterium* spp.

No presente estudo, quartos com diagnóstico negativo pela metodologia convencional e com CCS menor que 200×10^3 células/mL foram comparados a todos os quartos infectados por *Corynebacterium* spp. Houve efeito de *Corynebacterium* spp. sobre todas as variáveis estudadas. Em relação à CCS, quartos infectados por *Corynebacterium* spp. apresentaram CCS de 600×10^3 células/mL. Estes resultados diferem dos descritos por Bradley e Green (2005) que relataram que patógenos secundários apresentam CCS entre 50 a 150×10^3 células/mL. Wilson, Gonzalez e Das (1997) avaliaram 105.083 vacas em lactação e detectaram escores lineares de 3,9 ($\cong 478 \times 10^3$ células/mL) para mastite causada por *C. bovis*, e

de 3,5 ($\cong 374 \times 10^3$ células/mL) para mastites causadas por *Corynebacterium* spp., os quais apresentaram valores acima do escore linear 3,0 considerado limítrofe para vacas sadias.

Foi relatada diferença significativa entre quartos infectados por *Corynebacterium bovis* ($n=9.242$; $\ln\text{CCS}=3,96$) e quartos sadios ($n=11.152$; $\ln\text{CCS}=2,64$) (SCHEPERS et al., 1997). Schukken et al. (2009), descreveram CCS média de 399×10^3 células/mL para vacas com mastite subclínica causada por *Corynebacterium bovis*. Haltia et al. (2006) relataram alta prevalência de *C. bovis* ($n=1.640$) de amostras por quartos mamários ($n=11.649$) com CCS média de 303×10^3 células/mL. Estes autores relacionaram à alta prevalência de *C. bovis* a ausência de pré e pós-dipping, uma vez que apenas 7 das 25 fazendas (28%) utilizavam este tipo de manejo.

Resultados de CCS elevadas em quartos infectados por *C. bovis* (806×10^3 células/mL) foram relatados por Victória et al. (2005). Mettifogo et al. (1991), em amostras com isolamento de *C. bovis*, descreveram que em 70,67% das CCS variavam de 500×10^3 células/mL até 3.880×10^3 células/mL de leite, com média de 1.032×10^3 células/mL. Estes pesquisadores relataram a ocorrência de *C. bovis* em 25,77% das amostras de leite associadas à alta CCS, e por isso, sugeriram este micro-organismo como provável causador de mastite subclínica com consequentes prejuízos para glândula mamária e produção de leite. Zafalon et al. (1999) descreveram aumento de 548,2% na quantidade de células somáticas entre os quartos sadios e infectados por *C. bovis*. Estes resultados diferiram aos do presente estudo que obteve CCS menor (600×10^3 células/mL).

No presente estudo, todo o leite produzido foi coletado, na segunda ordenha de cada dia de coleta, por quartos individualmente de vacas selecionadas com diagnóstico prévio de IIM causada por *Corynebacterium* spp. A necessidade da ordenha completa dos quartos mamários para a realização de análises foi relatada por Urech, Puhán e Schällibaum (1999) ao testar diferentes métodos de amostragem para avaliação de mudanças nas frações de proteína de leite mastítico. Fontes de variação de proteína incluem o estágio de lactação e a mastite; e sendo assim, foram relatadas diferenças significativas entre teor o total de proteína e as taxas de caseína e proteína do soro de amostras de quartos em mastites subclínicas moderadas (URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999). Auldist et al. (1996) relataram que a proteína do leite é altamente dependente da capacidade genética da vaca. Estudos recentes baseados na amostragem de quartos individuais, com distúrbios na saúde do úbere, descreveram que a IIM acarreta alterações negativas na composição do leite, que podem passar despercebidas devido

ao efeito de diluição quando realizada amostragem composta (BERGLUND et al., 2007; FORSBÄCK et al., 2009; 2010a).

Além disso, a produção de gordura é altamente variável, e isto se deve a fatores nutricionais, ao esvaziamento e preenchimento de leite no úbere, ordenha, e/ou distúrbios do tecido secretor mamário. O teor de gordura no leite aumenta nos momentos finais da ordenha, por isso a necessidade de se coletar todo o leite produzido pelo quarto mamário para realização de análises composicionais e CCS (FORSBÄCK et al., 2009; 2010a, b). Resultados do efeito da mastite sobre a produção de gordura são inconclusivos. Auldist et al. (1995) relataram aumento nas concentrações de proteína total, nitrogênio não caseinoso e sódio no leite de vacas com IIM, porém baixas concentrações de gordura, lactose, proteína verdadeira e potássio, comparado ao leite de vacas sadias. A mastite resultou em aumento da proteína total e decréscimo nos teores de lactose e gordura (BANSAL et al., 2005).

Auldist et al. (1995) descreveram o comportamento dos componentes do leite no decorrer do ciclo lactacional, e assim, os componentes protéicos apresentaram-se aumentados na primeira fase lactacional, decresceram na segunda fase, e apresentaram-se aumentados na fase final de lactação. A gordura não apresentou um padrão, visto alta correlação a fatores de variação. A lactose apresentou concentração aumentada no pico de lactação, seguida de queda ao decorrer das fases lactacionais. De acordo com Forsbäck et al. (2010b), a lactose é o componente que menos sofre variação (0,9%), quando foi avaliada a variação dia-a-dia da produção e composição do leite.

A lactose é o componente mais estável do leite em vacas sadias, e isto pode ser devido à função osmótica regulatória que este componente exerce no leite. Entretanto, a estabilidade deste e de demais componentes do leite pode ser comprometida por IIM, pois ocorrem danos às células secretoras do epitélio mamário, o que pode resultar em afrouxamento das junções entre as células epiteliais (BARBANO; RASMUSSEN; LYNCH, 1991). Munro et al. (1984) descreveram decréscimo no teor de lactose durante a mastite. Assim, as mudanças nas concentrações de lactose durante a mastite podem ocorrer devido à passagem deste componente do leite para o sangue. No presente estudo, foi relatado em média decréscimo de 30 gramas de lactose por quartos mamários com isolamento de *Corynebacterium* spp. (n=190) em relação a quartos sadios (n=200). E desta forma, a baixa concentração de lactose no leite pode ser utilizada como critério para detecção de mastite (HARMON 1994; AULDIST et al., 1995). Além da baixa concentração de lactose, menor concentração de caseína foi observada em quartos de vacas com mastite subclínica em relação a quartos sadios.

Quanto à composição e produção de leite, quartos infectados pelo *Corynebacterium* spp. apresentaram menor produção de leite em relação aos quartos saudáveis, e além disso, menor produção de gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais e extrato seco desengordurado foram observados no leite de vacas com mastite ao se comparar aos quartos sem IIM. Estes resultados são similares aos de Forsbäck et al. (2009; 2010a) e Bansal et al. (2005); em que a IIM afeta a produção e composição de leite.

Quanto às espécies, devido a maior frequência da espécie *C. bovis*, quartos mamários infectados por esta espécie foram calculados separadamente das demais espécies não-lipofílicas. Entretanto, foram observados maior CCS nas IIMs causadas por *C. amycolatum* e *C. aquilae*, e decréscimo dos teores de gordura e proteína nas IIMs causadas por *C. amycolatum* e *C. casei* (Tabela 10). Um relato a se considerar, por exemplo, foi a IIM por *C. casei*, que apresentou baixa produção de leite e gordura (g/ordenha/quarto), porém CCS dentro do considerado normal (200×10^3 células/mL). Esta espécie possivelmente está relacionada ao processamento de queijos e produtos derivados lácteos. Brennan et al. (2001) encontraram *C. mooreparkense* e *C. casei* na superfície de queijos amadurecidos em gordura, como Limburger e Tilsit. Entretanto, apenas em um quarto mamário foi detectado a presença desta espécie, o que não foi possível avaliar esta e demais diferentes espécies não-lipofílicas quanto ao efeito de espécie. Não foram encontrados estudos sobre as potenciais alterações causadas pelas espécies não-lipofílicas a composição, produção e CCS de leite bovino. Houve decréscimo da média de CCS quando considerados apenas quartos mamários infectados por *C. bovis*.

Quanto à distribuição da mastite entre quartos, os quartos traseiros, tanto os negativos quanto os infectados, produziram mais leite do que quartos dianteiros. Estes resultados são similares a estudos que relataram maior produção de leite por quartos posteriores. Forsbäck et al. (2009; 2010a) descreveram resultados similares aos do presente estudo, que quartos saudáveis dianteiros e traseiros não apresentam diferença na CCS. Entretanto, os quartos infectados por *Corynebacterium* spp. apresentaram CCS maior para os quartos dianteiros em relação aos traseiros.

Produção e composição considerando os quartos mamários contralaterais

A produção de quartos mamários contralaterais saudáveis não difere entre si, entretanto ocorre maior produção de leite por quartos mamários posteriores em relação aos quartos

dianteiros. Adicionalmente, Berglund et al. (2007) descreveram que a composição do leite é similar entre quartos traseiros e dianteiros quando a CCS é menor que 100×10^3 células/mL. No presente estudo, a avaliação de quartos contralaterais baseados em ordenha individual, permitiu estimar o efeito da IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre as variáveis estudadas.

Houve efeito de IIM causada por *Corynebacterium* spp. sobre a CCS. Este resultado foi semelhante ao de LeVAN, Berhart e Esler (1985) e Ngatia e Jensen (1991), que descreveram CCS maior para os quartos infectados por *Corynebacterium* spp. em relação aos quartos sadios. No presente estudo, quartos infectados por *Corynebacterium* spp. apresentaram CCS maior em relação aos quartos sadios, porém a média da CCS de quartos infectados contralaterais apresentou-se abaixo do limiar padrão para quartos considerados sadios ($<200 \times 10^3$ céls/mL) (DOHOO; LESLIE; 1991), e foi similar aos resultados de LeVAN, Berhart e Esler (1985), Ngatia e Jensen (1991) e Brooks e Barnum et al. (1984). Entretanto, LeVAN, Berhart e Esler (1985), avaliaram apenas quartos contralaterais de *C. bovis*. Ward e Schultz (1972) e King (1978), descreveram que quartos infectados com *C. bovis* apresentaram CCS menor do que 200×10^3 células/mL, os quais foram considerados infrequentemente associados com o decréscimo na produção e mudanças na composição de leite. Forsbäck et al. (2010a) não descreveram especificamente quartos acometidos por *Corynebacterium* spp., entretanto compararam quartos mamários sadios de CCS média entre 200 a 300×10^3 células/mL, perfil muito semelhante a mastite causada pelo *Corynebacterium* spp. Estes pesquisadores relataram significativas diferenças nas variáveis produção de leite (kg), lactose (%), e LogCCS entre quartos saudáveis e infectados de três grupos de animais envolvidos no estudo, as quais diferiram do presente estudo que diferiu significativamente apenas para variável CCS.

Um experimento baseado na colonização experimental do canal do teto por *C. bovis* foi avaliado quanto ao efeito da CCS no leite bovino (BROOKS; BARNUM, 1984). Estes pesquisadores descreveram diferença altamente significativa entre quartos antes e após exposição à bactéria. Entretanto, estes relataram CCS $<200 \times 10^3$ céls/mL, e por isso sugeriram que *C. bovis* possivelmente coloniza o canal do teto.

Não houve efeito de IIM por *Corynebacterium* spp. entre quartos contralaterais sobre as variáveis, produção de leite, gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, os quais foram resultados similares ao relatados por LeVAN, Berhart e Esler (1985). Entretanto, os mesmos autores descreveram perda de produção de leite pela mastite causada por *Corynebacterium bovis* de 180g/dia.

Cinco espécies de *Corynebacterium* não-lipofílicas foram responsáveis pelo aumento de 31% da média geral de CCS por gênero. Este resultado diferiu daquele descrito por Wilson, Gonzalez e Das (1997), os quais apresentaram maior CCS por meio de escore linear para *C. bovis* (3,9) em relação as demais espécies de *Corynebacterium* spp. (3,5).

Não foi possível avaliar o efeito de espécies de *Corynebacterium* não-lipofílicas pela metodologia de quartos contralaterais, devido a baixa frequência das mesmas. Assim como, número maior de amostragem de quartos mamários seriam necessários para aumentar a probabilidade de isolamento de espécies de *Corynebacterium* não-lipofílicas, e consequentemente, avaliar o efeito de espécie pelo segundo modelo estatístico para quartos contralaterais.

4.5 Conclusão

A infecção intramamária causada por *Corynebacterium bovis* não tem efeito sobre a produção e composição de leite. Entretanto, a IIM causada por *Corynebacterium bovis* aumenta a CCS. A metodologia de ordenha individual por quartos mamários e o uso de quartos contralaterais avalia o efeito de IIM bovina causada por patógenos sobre a produção, composição e CCS, quando utilizado o delineamento por *strip-plot*. A espécie mais prevalente de *Corynebacterium* spp. é *C. bovis* em IIM em vacas leiteiras.

5 CONCLUSÕES

A infecção intramamária causada por *Corynebacterium bovis* não apresenta efeito sobre a produção e composição de leite. Entretanto, a IIM por *Corynebacterium bovis* apresenta efeito para variável CCS. A espécie mais prevalente de *Corynebacterium* spp. é *C. bovis*.

Houve equivalência de resultados de 95% entre as duas técnicas de identificação utilizadas. A técnica de MALDI/TOF-MS com o uso da extração em tubo por ácido fórmico/acetonitrila foi aplicada com 91,57% de sensibilidade de identificação das espécies de *Corynebacterium* nos casos de mastite bovina subclínica, quando comparado aos resultados do sequenciamento de genes 16S rRNA.

REFERÊNCIAS

- ALATOOM, A. A.; CAZANAVE, C. J.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; PATEL, R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 160-163, 2012.
- ALLEN, J. C. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 975–984, 1990.
- ANDERSEN, S.; DOHOO, I.R.; OLDE RIEKERINK, R.; STRYHN, H. Diagnosing intramammary infections : Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2966-2975, 2010.
- ARAVENA-ROMAN, M.; BOWMAN, R.; O'NEILL, G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Pathology**, v.27, p. 71-73. 1995
- AUAD, A. M.; SANTOS, A. M. B.; CARNEIRO, A. V. **Manual de Bovinocultura Leiteira**. 1.ed. Brasília: LK Editora; Belo Horizonte: SENAR-AR/MG; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010. 608p.
- AULDIST, M. J.; COATS, S.; SUTHERLAND, B. J.; MAYES, J. J.; MCDOWELL, G. H.; ROGERS, G. L. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 269–280, 1996.
- AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MCDOWELL, G. H. Changes in the composition in milk from healthy and mastitic cow during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 427–436, 1995.
- AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy product. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28–37, 1998.
- BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKIT, N.T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 144-152, 2005.
- BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R.; LYNCH, J. M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 369–388, 1991.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J.; GALLIGAN, D. T.; BEIBOER, M. L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1592-9, 1997.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877-95, 2006.

BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; SANVIDO, G. B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖTTCHER, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661-7, 2010.

BARREIRO, J. R. **Fingerprinting por espectrometria de massas para diagnóstico de patógenos em mastite**. 2011. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A; COSTA, E. O. Evaluation of the microbiological status of milk and various structures in mammary glands from naturally infected dairy cows. **Tropical animal health and production**, v. 35, p. 301-307, 2003.

BERGLUND, I.; PETTERSON, G.; ÖSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter milking for improved detection of increased SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 427-432, 2007.

BERRY, D. P.; MEANEY, W. J. Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, p. 81-91, 2006.

BEXIGA, R.; PEREIRA, H.; LEITÃO, A.; CARNEIRO, C.; ELLIS, K. A.; VILELA, C. L. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of a teat cannula. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 9-14, 2011.

BLACK, R. T.; MARSHALL, R. T.; BOURLAND, C. T. Locus of mammary gland infections of *Corynebacterium bovis*. **Journal of Dairy Research**, v. 55, p. 413-416, 1972.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds**, 2 Ed. London: CAB international, 2010. p. 266.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4104-4114, 2004.

BOYER, P. Mastitis in dairy herds associated with *Corynebacterium bovis*. **Veterinary Record**, v. 143, p. 175-176, 1998.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. A etiology of clinical mastitis in six somerset dairy herds. **Veterinary Record**, v. 148, p. 683-688, 2001.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **Farm Animal Practice**, v. 27, p. 310-315, 2005.

BRAMLEY, A. J. Infection of the bovine udder with coagulase negative micrococci and *Corynebacterium bovis*. **Proceedings of seminar on mastitis control**. Brussels (Int Dairy Fed Doc 85). 1975.

BRENNAN, N. M.; BROWN, R.; GOODFELLOW, M.; WARD, A. C.; BERESFORD, T. P.; SIMPSON, P. J.; FOX, P. F.; COGAN, T. M. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov., and *Corynebacterium casei* sp. nov. isolated from the surface of a smear-ripened cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 843–852, 2001.

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, 1999a.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Diagnóstico Microbiológico da Mastite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999b. 26p. (Circular Técnica, 55).

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.

BROOKS, B. W.; BARNUM, D. A. Experimental colonization of the bovine teat duct with *Corynebacterium bovis* and the effect on milk somatic cell counts. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 141-145, 1984.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; de MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R. R.; SILVA, J. A. B.; da COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; COUTO, D. V. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga- SP-Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, p. 33-44,, 2003.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.-L.; COTTYN S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2156-2161, 2007.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; De BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 75-83, 2002.

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.

COSTA, E. O.; CARVALHO, V. M.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; COROMORI, L. F. L. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 117-120, 1985.

COYLE, M. B.; LIPSKY, B. A. Coryneform bacteria in infectious diseases: Clinical and laboratory aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 227–246, 1990.

COYLE, M. B.; HOLLIS, D. G.; GROMAN, N. B. *Corynebacterium* spp. and other coryneform organisms. In: LENNETTE, E. H. (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**, 4 Ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 193-204. 1985.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. 1 Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 608p.

DELUYKER, H. A.; GAY, J. M.; WEAVE, L. D. Interrelationships of Somatic Cell Count, Mastitis, and Milk Yield in a Low Somatic Cell Count Herd. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3445-52, 1993.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: A meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, p. 335–357, 2002.

DOHOO IR, SMITH J, ANDERSEN S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S.; MASTITIS RESEARCH WORKERS CONFERENCE. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 250–61, 2011a.

DOHOO IR, SMITH J, ANDERSEN S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S.; MASTITIS RESEARCH WORKERS CONFERENCE. Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5515-5522, 2011b.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, p. 225-237, 1991.

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

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 941-945, 2010.

FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R.; MOURA, A. A. A. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1944-1952, 2002.

FETROW J, STEWART S, EICKER S.; FARNSWORTH, R.; BEY, R. Mastitis: an economic consideration. In: **National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings**. Madison (WI). Atlanta (GA): National Mastitis Council; 2000. p. 3–47.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, A.; ANDRÉN, A.; ÅKERSTEDT, M.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal : an International Journal of Animal Bioscience**, v. 3, p. 710-717, 2009.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 4, p. 617-26, 2010a.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; AKERSTEDT, M.; ANDRÉE, L.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3569-77, 2010b.

FORSBÄCK, L. **Bovine Udder quarter milk relation to somatic cell count**. 2010. 70p. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Switzerland, 2010c.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1998. 479 p.

FOX, L.K.; SHOOK, G.E.; SCHULTZ, L.H. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2100-2107, 1985.

FRENEY, J.; DUPERRON, M. T.; COURTIER, C.; HANSEN, W.; ALLARD, F.; BOEUFGRAS, J. M.; MONGET, D.; FLEURETTE, J. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 38-41, 1991.

FROST, A. J. Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. **Infection and Immunity**, v. 12, p. 1154-1156. 1975

FUNKE, G.; PETERS, K.; ARAVENA-ROMAN, M. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2439-2442, 1998.

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.

GREEN, M. J.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; SCHUKKEN, Y. H.; BRADLEY, A. J. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 85, p. 2589-2599, 2002.

GREEN, L.E.; SCHUKKEN, Y.H.; GREEN, M.J. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count? **Preventive veterinary medicine**, v. 76, p. 74-89, 2006.

GRINBERG, N.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I.; SHPIGEL, N. Y. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 2802-2807, 2008.

GRÖHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZÁLEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3358-3374, 2004.

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.

HALTIA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, R.; SPIRIDONOVA, I.; OLKONEN, A.; MYLLYS, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, p. 22, 2006.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3ra. Ed. Arlington: National Mastitis Council, Inc. 1990. 34p.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, p. 2103–2112, 1994.

HECK, J. M. L.; SCHENNINK, A.; VAN VALENBERG, H. J.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M. H.; VAN ARENDONK, J. A.; VAN HOOIJDONK, A. C. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1192-1202, 2009a.

HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; DIJKSTRA, J.; VAN HOOIJDONK, A. C. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4745-55, 2009b.

HILLERTON, J. E.; BRAMLEY, A. J.; STAKER, R. T.; MCKINNON, C. H. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 39–50, 1995.

HILLERTON, J. E.; COOPER, J.; MORELLI, J. Preventing bovine mastitis by a postmilking teat disinfectant containing acidified sodium chlorite. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1201–1208, 2007.

HODGKINSON, A. J.; CARPENTER, E. A.; SMITH, C. S.; MOLAN, P. C.; PROSSER, C. G. Adhesion molecule expression in the bovine mammary gland. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 205-215, 2007.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3 Ed. New York: Wiley-Interscience, 2007. 502p.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Rate of environmental mastitis in quarter infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* sp. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2510-2525, 1988.

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.

HOGAN, J. S.; PANKEY, J. W.; DUTHIE, A. H. Growth Responses of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* to *Corynebacterium bovis* Metabolites. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p.1294-1301, 1986.

HOGVEEN, H.; SAMPIMON, O. C.; HANEKAMP, W. J. A.; SOL, J. Monitoring sub clinical intramammary infections on a low bulk milk somatic cell count farm. In: International Dairy Housing Conference, 4, 1998, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis, 1998, p. 9-16.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 954-957, 1999.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; ANDERSON, J.C., BRAMLEY, A.J. The virulence of strains of *Corynebacterium bovis* in the mammary gland of the mouse and the effect of corynebacterial mastitis on subsequent infection with *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 14, p. 519-28, 1985.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, p. 1-20, 1998.

HUXLEY, J. N.; HELPS, C. R.; BRADLEY, A. J. Identification of *Corynebacterium bovis* by endonuclease restriction analysis of the 16S rRNA gene sequence. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 38-45, 2004.

HUXLEY, J. N.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. *Corynebacterium bovis* – friend or foe? **Proceedings of the British Mastitis Conference**. Garstang, Institute for Animal Health, 2003, p. 23-24.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis**. Bulletin 24. Brussels, Belgium. 1987.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Animal Health Newsletter**. Issue 5. Brussels, Belgium, 2011.

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

KELLY, A. L. Milk biochemistry. In: GRIFFITHS, W. **Improving the safety and quality of milk: Volume 1 Milk production and processing**, 1 ed. Cambridge: Woodhead, 2010. Cap. 1, p. 2-26.

KHATE, K.; B. R. YADAV. 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.

KING, J. O. Cell counts and composition of bovine milk. **Veterinary Record**, v. 103, p. 397-398, 1978.

KITCHEN, B. J. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 299-305, 1999.

KONRAD, R.; BERGER, A.; HUBER, L.; BOSCHERT, V.; HÖRMANSDORFER, S.; BUSCH, U.; HOGARDT, M.; SCHUBERT, S.; SING, A. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles. European Communicable Disease Bulletin*, v. 15, p. 1-5, 2010.

KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Veterinary Journal*, v. 154, p. 41-51, 1997.

KOSSAIBATI, M. A. The costs of clinical mastitis in UK dairy herds. *Cattle Practice*, v. 8, p. 323-328, 2000.

LAFFRANCHI, A.; ECKEHARDT, M.; FREITAS, J. C.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; SALVADOR, R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, v. 31, p. 1027-1032, 2001.

LAM, T. J.; VAN VLIET, J. H.; SCHUKKEN, Y. H.; GROMMERS, F. J.; VAN VELDEN-RUSSCHER, A.; BARKEMA, H.W.; BRAND, A. The effect of discontinuation of postmilking teat disinfection in low somatic cell count herds. I. Incidence of clinical mastitis. *Veterinary Quarterly*, v. 19, 41-7, 1997.

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

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 648-654, 2006.

LESLIE, K. E.; PETERSSON-WOLFE, C. S. Assessment and Management of Pain in Dairy Cows with Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, p. 289-305. 2012.

LEVAN, P. L.; BERHART, R. J.; ESLER, E. Effects of natural intramammary *Corynebacterium bovis* infection on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 3329-3336, 1985.

LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 113, p. 248-255, 2006.

LOSINGER, W. C. Economic impacts of reduced milk production associated with and increase in bulk-tank somatic cell count on US dairies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 226, p. 1652-1658, 2005.

MELLMANN, A.; CLOUD, J.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LASALA, P.; KOSTRZEWA, M.; HARMSSEN, D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 1946-1954, 2008.

METTIFOGO, E.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; JANE, M.; ALFIERI, A. A.; VANERLI, B. Subclinical mastitis attributable to *Corynebacterium bovis* in cattle from Northern Paraná, Brazil. **Semina Londrina**, v.12, p.41-44, 1991.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574-581, 2006.

MILLER, R. H.; EMANUELSSON, U.; PERSSON, E.; BROLUND, L.; PHILIPSSON, J.; FUNKE, H. Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculture Scandinavica**, v. 33, p. 209-223, 1983.

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, p. 7-16, 1984.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of Bovine Mastitis. Madison, 1996. 64p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Current Concepts of Bovine Mastitis**. Madison: WI, NMC Inc., 4 Ed. p. 1-64. 1999.

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

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). 2001. National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. <http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf> Accessed Oct. 14, 2012.

NGATIA, T. A.; JENSEN, N. E.; ERG, B. B. Changes in the bovine udder quarts naturally infected by *Corynebacterium bovis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 147, p. 463-468, 1991.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D. F.; SCHOLL, D. T.. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of dairy science**, v. 91, p. 1366-77, 2008.

OLIVER, S. P.; JUNEJA, V. K. Growth of *Corynebacterium bovis* in mammary secretions during physiological transitions of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 73, 351-356, 1990.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATÍÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **The Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p. 109-21, 2002.

- PALACIOS, L.; VELA, A. I.; MOLIN, K.; FERNÁNDEZ, A.; LATRE, M. V.; CHACÓN, G.; FALSEN, E.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. Characterization of some bacterial strains isolated from animal clinical materials and identified as *Corynebacterium xerosis* by molecular biological techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3138-3145, 2010.
- PANKEY, J. W.; NICKERSON, S. C.; BODDIE, R. L.; HOGAN, J. S. Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2684-2693, 1985.
- PARKER, K. I.; COMPTON, C. W.; ANNISS, F. M.; HEUER, C.; MCDOUGALL, S. Quarter-level analysis of subclinical and clinical mastitis in primiparous heifers following the use of a teat sealant or an injectable antibiotic, or both, precalving. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 169–181, 2008.
- PASCUAL, C.; LAWSON, P. A.; FARROW, J. A. E.; GIMENEZ, M. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 724-728, 1995.
- PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P.H.F.; COSTA Jr., L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Epamig, 2001. 234 p.
- PHILPOTT, W. N. Economics of mastitis control. **Veterinary Clinics of North America-Large Animal Practice**, v. 6, p. 233-45, 1984.
- PHILPOTT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/ Westefali Landtechnik do Brasil, 2002. 188p.
- PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2433–2441. 2004.
- POCIECHA, J. Z. Influence of *Corynebacterium bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. **Veterinary Record**, v. 125, p. 628, 1989.
- PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci — emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 3–8, 2009.
- RAINARD, P.; POUTREL, B. Dynamics of nonclinical bovine intramammary with major and minor pathogens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 2143-2146, 1982.
- RUELLE, V.; MOUALIJ, B. E.; ZORZI, W.; LEDENT, P.; PAUW, E. D. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM**, v. 18, p. 2013-2019, 2004.
- RYSAANEK, D.; BABAK, V.; ZOUHAROVA, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. **Veterinary Medicina**, v. 6, p. 223–230, 2007.

RYSANEK, D.; BABAK, V. Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 400–405, 2005.

SANTOS, O. C. S., BARROS, E. M., BRITO, M. A. V. P., BASTOS, M. C. F., SANTOS, K. R. N. S., MARVAL, M. G. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology**, v.130, p. 134-140, 2008.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2491–503, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1. ed. Barueri: Manole. 2007. 314p.

SANTOS, M. V. **Efeitos do nível de células somáticas e de gordura no leite, da temperatura de armazenamento e da multiplicação microbiana sobre a proteólise e lipólise do leite pasteurizado**. 2001. 140p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SCHALLIBAUM, M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: **National Mastitis Council**, Inc. 40th Annual Meeting Proceedings, p. 38-46, 2001.

SCHALM, O. W.; LASMANIS, J.; CARROLL, E. J. Pathogenesis of experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 75-82, 1964.

SCHEPERS, A. J.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M.; HANEKAMP, W. J. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1833-40, 1997.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, p. 579-596, 2003.

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: XXVII World Buiatrics Congress, p. 145-148, 2012. Lisbon Portugal. **Anais...** Lisbon: Lisbon Congress Center, 2012. 178p.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLES, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: nothing to worry about?. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 9-14, 2009.

SCHUKKEN, Y. H.; SMIT, J. A. H.; GROMMERS, F. J.; VAN DE GEER, D.; BRAND, A. Effect of Freezing on Bacteriologic Culturing of Mastitis Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1900–1906, 1989a.

SCHUKKEN, Y. H.; VAN DE GEER, D.; GROMMERS, F. J.; SMIT, J. A.; BRAND, A. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cells counts in bulk milk. **Veterinary Record**, v. 125, p. 393-396, 1989b.

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, 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.

SILVA, L. F. P.; ETCHEBARNE, B. E.; NIELSEN, M. S. W.; LIESMAN, J. S.; KIUPEL, M.; VANDEHAAR, M. J. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3034–44. 2008.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2 Ed., San Diego-EUA: MCC Press, 2006. 257p.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992.

SORDILLO, L. M.; S. L. AITKEN. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 104-109, 2009.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: bovine immunology Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

SORDILLO, L. M.; DOYMAZ, M. Z.; OLIVER, S. P.; DERMODY, J. T. Leucocytic infiltration of bovine mammary parenchymal tissue in response to *Corynebacterium bovis* colonization. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 1045-1051, 1989

SORDILLO, L. M. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility in the Transition Cow. In: **Elanco Dairy Science Symposium**, 2012, Chicago, Illinois.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; MELVILLE, P. A.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **The Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 63-70, 2010.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **The Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 121-127, 2008.

SOUZA, M. S. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 164p. Tese

(Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2008.

STELWAGEN, K.; FARR, V.C.; MCFADDEN, H.A. Alteration of the sodium to potassium ratio in milk and the effect on milk secretion in goats. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 52-59, 1999.

SUMMERS, C.; RANKIN, S. M.; CONDLIFFE, A. M.; SINGH, N.; PETERS, A. M.; CHILVERS, E. R. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, p. 318-324, 2010.

SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R.N; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2329-2340, 2011.

SUVAJDZIC, L.; POTKONJAK, A.; MILANOV, D.; LAKO, B.; KOCIC, B.; MILIC, N.; CABARKAPA, I. A Proposal of a Diagnostic Protocol for Isolation of *Corynebacterium ulcerans* from Cow's Milk. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p. 1039-1046, 2012.

TANCIN, V.; UHRINCAT, M.; MACUHOVA, L.; BRUCKMAIER, R. M. Effect of pre-stimulation on milk flow pattern and distribution of milk constituents at a quarter level. **Czech Journal of Animal Science**, v. 52, p. 117–121, 2007.

THEEL, E. S.; SCHMITT, B. H.; HALL, L.; CUNNINGHAM, S. A.; WALCHAK, R. C.; PATEL, R.; WENGENACK, N. L. Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 3093-3095, 2012.

TIMM, C. D.; BERMURDES, R. F.; LADEIRA, S. L.; CRUCIO, B. R.; MELLO, D. F. M. Manejo de la antisepsia post-ordeña en el control de la mastitis por *Corynebacterium bovis*. In: **7º Congreso Panamericano de la Leche**, 2000. Havana: Anales del 7º Congreso Panamericano de la Leche, 2000.

TOLLE, A.; HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J.; ZEIDLER, H. Counting of somatic cells in milk and possibilities of automation. **Dairy Science Abstracts**, v. 33, p. 875-879, 1971.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2402-2411, 1999.

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; de BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; de ROUCK, A.; CLAEYS, G. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in microbiology**, v. 146, p. 633-641, 1995.

VICTÓRIA, C.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O.; LANGONI, H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, v.8, p.161-164, 2005.

VILA, J.; JUIZ, P.; SALAS, C.; ALMELA, M.; de la FUENTE, C. G.; ZBOROMYRSKA, Y.; NAVAS, J.; BOSCH, J.; AGÜERO, J.; de la BELLACASA, J. P.; MARTÍNEZ-

MARTÍNEZ, L. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 1745-1747, 2012.

WATTS, J. L.; LOWERY, D. E.; TEEL, J. F.; ROSSBACH, S. Identification of *corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2373-2379, 2000.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 16, p. 41-66, 1988.

WARD, G.E.; SCHULTZ, L.H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1428-1431, 1972.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 467p.

WELKER, M. Proteomics for routine identification of microorganisms. **Proteomics**, v.11, p. 3143-3153, 2011.

WILSON, D. J.; GONZÁLES, R. N.; HERTL, J.; SCHULTE, H. F.; BENNETT, G. J.; SCHUKKEN, Y. H.; GRÖHN, Y. T. Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2073-2084, 2004.

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, p. 2592-2598, 1997.

WIN, W. C.; ALLE, S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1565p.

WOODWARD, W. D.; BESSER, T. E.; WARD, A. C.; CORBEIL, L. B. In vitro Growth Inhibition of Mastitis Pathogens by bovine teat skin normal flora. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 27-31, 1987.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 357-372, 2011.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; HAGENAARS, T. J.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 397-416, 2002.

ZAFALON, L. F.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; OLI- VEIRA, J. V. Influência das bactérias do gênero *Corynebacterium* e *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos, sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Revista do NAPGAMA**, v. 2, p. 4-6, 1999.