RODRIGO MALZONI DE SOUZA

**Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de
neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associadas à
mastite em vacas primíparas e multíparas**

São Paulo

2017

RODRIGO MALZONI DE SOUZA

Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associadas à mastite em vacas primíparas e multíparas

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Alice M. Melville Paiva Della Libera

De acordo com: _____

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3572
FMVZ

Souza, Rodrigo Malzoni de
Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por
distintas cepas de estafilococos associadas à mastite em vacas primíparas e múltiparas /
Rodrigo Malzoni de Souza. -- 2017.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Infecção intramamária. 2. Resposta imune. 3. Virulência bacteriana. 4. Estafilococos
não-aureus (SNA). I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associados à mastite em vacas multíparas e primíparas", protocolada sob o CEUA nº 8801080715, sob a responsabilidade de **Alice Maria Melville Paiva Della Libera e equipe; Rodrigo Malzoni de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 11/02/2016.

We certify that the proposal "Ability of bovine-associated staphylococci species and strains to resist phagocytosis and bactericidal killing by neutrophils in primiparous and multiparous dairy cows mastitis", utilizing 12 Bovines (12 females), protocol number CEUA 8801080715, under the responsibility of **Alice Maria Melville Paiva Della Libera and team; Rodrigo Malzoni de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/11/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/15 a 08/17

Área: Clínica Médica Veterinária

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: a

N: 12

Linhagem: Holandesa

Peso: a

Resumo: Dentre os agentes causadores da mastite bovina, as bactérias do gênero estafilococos se destacam, e podem ser subdivididas quanto à prova da coagulase em estafilococos coagulase positiva, sendo *Staphylococcus aureus* o patógeno mais relevante, e os estafilococos coagulase negativa (ECN). Dado que o microrganismo tenha atravessado o canal do teto, diversos fatores solúveis e celulares passam a atuar na defesa da glândula mamária. Desta forma, se ocorrer alguma falha durante esse processo, uma nova infecção poderá se manifestar e eventualmente, tornar-se crônica. Estudos prévios já relataram que cepas de *S. aureus* e ECN são capazes de resistir à fagocitose e à morte por neutrófilos e macrófagos, o que pode contribuir com a infecção crônica por estes patógenos. Sendo assim, acreditamos que as variações no perfil de resistência à fagocitose e/ou atividade microbiana dos fagócitos frente à diversidade de cepas de estafilococos podem, pelo menos, explicar em parte, as variações no perfil das infecções intramamárias (exemplo: transiente x persistente). O presente estudo irá investigar e comparar a fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos do sangue e do leite de vacas em lactação, à 48 distintas cepas de estafilococos, sendo 12 de *S. aureus* e 36 de ECN, provenientes do banco de bactérias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais [UFMG], da The Ohio State University (EUA) e da Faculty of Veterinary Medicine [Ghent] (Bélgica).

Local do experimento:

São Paulo, 25 de outubro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 15 de março de 2017
CEUA N 8801080715

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Área: Clínica Médica Veterinária

Alice Maria Melville Paiva Della Libera (orientador)

Título da proposta: "Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associados à mastite em vacas multiparas e primíparas".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 20/fevereiro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Marcação das bactérias 2. Qual o N amostral alocado até o momento? Resp: Não se aplica para a fase atual do projeto 3. Houve algum efeito adverso ao longo do estudo que causasse algum tipo de prejuízo ao bem estar dos animais? Se sim, qual foi? Resp: Não se aplica para a fase atual do projeto 4. Como os pesquisadores lidaram com a situação? Resp: Não se aplica para a fase atual do projeto 5. Houve alguma mudança em relação ao material e método por conta desta ocorrência? Resp: Não se aplica para a fase atual do projeto 6. O estudo terá continuidade, a despeito da ocorrência do efeito adverso? Resp: Não se aplica para a fase atual do projeto 7. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: 3 meses 8. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Não 9. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Não".

Comentário da CEUA: "O estudo ainda está em andamento e não há mudanças previstas".

Profª. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Rodrigo Malzoni

Título: **Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associadas à mastite em vacas primíparas e multíparas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária 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: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo e Regina, e aos meus irmãos, Guilherme e Izabel.

Sem vocês, nenhuma conquista valeria a pena...

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

... a Deus, por sempre permanecer ao meu lado e que me deu a maior força para ultrapassar os momentos mais difíceis dessa jornada.

... à minha família, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e conselhos, durante toda a minha vida.

... à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, que sempre acreditou em mim, que sempre me incentivou e que me fez amadurecer pessoalmente e profissionalmente... “que tem me ensinado sobre os caminhos, caminhar e destinos, que o chegar não é mais valioso que a andança, que o encontro é precioso e necessário...” Tim tim

... à Camila Freitas Batista, pelo companheirismo.

Ca, palavras não expressam a minha gratidão por tudo que você fez. Sua companhia e ajuda foram fundamentais do começo ao fim. Meu eterno muito obrigado!

... à Jéssyca Beraldi Bellinazzi, pela solidariedade.

Jeh, obrigado pela constante prontidão em ajudar e pelo carinho. Obrigado pelo apoio e alegria nos momentos mais difíceis. Você é para sempre!!

... à Kamila Reis Santos, pela convivência.

Ka, obrigado pela ajuda de sempre desde o início de tudo. Muito obrigado!

... ao Fernando Nogueira Souza, pela confiança.

Fê, obrigado por toda ajuda e atenção de sempre! Obrigado pelos ensinamentos, dicas, contatos, enfim... por acreditar que eu era capaz de realizar este trabalho! Muito obrigado!

... à Maiara Garcia Blagitz, pelo aprendizado.

Ma, muito obrigado pelos ensinamentos e pela prontidão em ajudar, mesmo de tão longe.

... ao José Augusto Ferronato, pela ajuda.

José, muito obrigado por tudo, desde o primeiro momento até o final.

... aos demais colegas de equipe, família científica: Aline Silva, Paula Cristina Molinari e Deisiane Soares Nobre, que me ajudaram em tudo que era possível, por mais breve que tenha sido a convivência, o meu muito obrigado! Aos mais “antigos”, rs, Renata Caminha Gomes e Heloisa Godoi Bertagnon pelo apoio, mesmo que distante.

... à minha querida amiga Camila Cecilia Martin, por tudo!!

Ca, Mi, desde o primeiro momento que a gente se conheceu eu já sabia que era para sempre! Da residência para a vida, sempre juntos... obrigado por me acompanhar, me ajudar, me ouvir, me incentivar e por todos os momentos compartilhados!! A irmã que a vida me deu... amo vc!

... à Natalia Minami, pela amizade e risadas!

Min, obrigado por toda ajuda desde sempre! Nunca conseguirei agradecer à altura. Obrigado pela positividade, conselhos e, principalmente, pelas inúmeras e mais deliciosas risadas!! Momentos ao seu lado são únicos e para sempre!! Muito obrigado!

... à Marcela Romanini Faria, pela amizade.

Ma, obrigado por toda força e palavras de carinho durante todo o tempo que a gente se conhece. Mesmo que mais distantes, sua amizade é muito importante e para vida toda!! Muito obrigado por tudo!!

... aos amigos/irmãos da residência, pela amizade e companheirismo.

Gabi, Bruno, Joel, Giu, Elisa e Mailson, obrigado por tudo!!

... aos amigos do Programa de Pós-Graduação: Camila Baccili, Natalia Sobreira, Jean Ramos, Karen Nascimento, Caroline Seino, Carolina Shecaira, Juliana Bombardelli, Rejane Sousa, Leonardo Barreira, Mario Reyes, Bruna Barbosa, Carolina dos Anjos, Ronaldo Gargano, Fábio Sellera, Priscilla Nascimento, e Débora Carvalho, pela amizade, companheirismo e ajuda! Sucesso a todos!!!

... aos Residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) de 2015 a 2017!!! Muito obrigado pela ajuda, sempre que precisei!!

... aos Professores do Departamento de Clínica Médica (VCM): Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profª Drª Lílian Gregory, Profª Drª Maria Cláudia Araripe Sucupira e Profª Drª Viviani Gomes.

... à Secretária da pós-graduação do VCM, Adelaide Fátima de Jesus Borges, pela ajuda e dedicação durante essa fase!

*... à Claudia Regina Stricagnolo, por toda ajuda e serviços prestados!
Claudia, muito obrigado pela ajuda e apoio, você fez muito por mim!*

*... à querida Dinha, pela ajuda, comidas, conversas e conselhos!
Dinha, muito obrigado por tudo! A sua ajuda foi essencial durante toda a minha jornada! Muito obrigado pelo carinho e positividade de sempre! Obrigado pelas cantorias...*

... à toda equipe dos Laboratórios do VCM: Clara Mori, Creide Donizete Costa e Maria Helena da Silva Pelissari, pela ajuda e esclarecimento de dúvidas. Muito obrigado!

*... ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, pela ajuda e apoio!
Professor, muito obrigado por ceder o laboratório e parte do seu material para a realização deste projeto. Seus conselhos e sua preocupação constante, só me motivaram ainda mais. Obrigado por tudo mais uma vez!*

... à toda equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB-VPS) pela ajuda constante, risadas e conselhos! Gi, Antônio, Ju e Israel, tudo ficava mais fácil e prazeroso quando vocês estavam por lá! Muito obrigado! Sucesso a todos! Agradeço também à Sandra (Lab. de Alimentos), por toda ajuda prestada quando necessário!

... à equipe do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) da FMVZ-USP (Campus Pirassununga) por ter cedido os animais!

Professor Rennó e Guilherme, muito obrigado pela ajuda no momento em que a gente mais precisava! Vocês abriram as portas para que grande parte do experimento pudesse ser realizada, contribuindo muito para o meu trabalho. Meus eternos agradecimentos...

... às equipes do Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite – Clínica do leite (ESALQ-USP) e do Laboratório Vida Vet, por realizar o processamento de parte das amostras. Muito obrigado!

... à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2015/16871-6) pelo auxílio pesquisa possibilitando a realização deste trabalho.

... a todos os Pesquisadores envolvidos neste projeto: Cristina Oliveira Massoco Salles Gomes (VPT FMVZ-USP), Sarne De Vliegheer (Faculty of Veterinary Medicine – Ghent University), Sofie Piepers (Faculty of Veterinary Medicine – Ghent University), Luciana B. Casimiro da Costa (College of Veterinary Medicine – The Ohio State University), Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira (Escola de Veterinária – UFMG). Por menor que tenha sido a participação, o meu muito obrigado!

.... a todos os animais, envolvidos ou não neste projeto, pelo exemplo de seres que são. Precisamos aprender muito com vocês...

Muito obrigado!

*“Sentir tudo de todas as maneiras,
Viver tudo de todos os lados,
Ser a mesma coisa de todos os modos possíveis ao mesmo tempo,
Realizar em si toda a humanidade de todos os momentos
Num só momento difuso, profuso, completo e longínquo.
...”*

Fernando Pessoa

RESUMO

SOUZA, R.M. **Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associadas à mastite em vacas primíparas e multíparas.** [Ability to resist to phagocytosis and bactericidal activity of neutrophils by distinct strains of staphylococci associated with mastitis in primiparous and multiparous cows] 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O grupo de estafilococos não-*aureus* (SNA), frequentemente isolados de quartos mamários com mastite subclínica, ápice do teto e ambiente, possui variabilidade ecológica que desafia a compreensão da patogenia a estes atribuída. Os fatores espécie-específicos associados à essa infecção ainda não foram identificados e a susceptibilidade difere entre vacas e quartos e promove diferentes perfis de infecção. Com o objetivo de avaliar a resistência à fagocitose e atividade microbicida, comparou-se a viabilidade, a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a fagocitose de neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas frente a distintos isolados viáveis de estafilococos. Utilizou-se doze vacas sadias (seis primíparas e seis multíparas) em terço médio de lactação e 50 isolados viáveis de estafilococos (38 SNA e 12 *Staphylococcus aureus*) de diferentes nichos ecológicos. A viabilidade de neutrófilos ($P = 0,55$), produção de ERO ($P = 0,12$) e atividade funcional dos fagócitos ($P = 0,33$) foram semelhantes entre as primíparas e multíparas testadas. Contudo, foram observadas diferenças ($P \leq 0,05$) entre os distintos grupos de espécies e estirpes de estafilococos quanto ao estímulo da produção intracelular de ERO pelos neutrófilos e à fagocitose. *S. chromogenes* de origens distintas, ápice do teto ($P = 0,01$), infecção intramamária transiente ($P < 0,01$) e infecção intramamárias persistente ($P < 0,01$) estimularam mais a produção de ERO pelos neutrófilos do que as outras espécies. Todos isolados foram fagocitados pelos neutrófilos, mas *S. chromogenes* resistiram mais eficientemente que as outras espécies de SNA, principalmente, *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0,01$). *S. haemolyticus* isolados do ápice do teto ($P = 0,02$) e infecção intramamária transiente ($P < 0,01$), assim como, *S. fleurettii* ($P < 0,01$), foram substancialmente fagocitados do mesmo modo que *S. aureus* isolado de suabe nasal ($P = 0,03$). Mais evidente do que possíveis variações entre as respostas mamárias de

primíparas e múltiparas é a variação entre os SNA. Quanto mais adaptado à mama, maior resistência à fagocitose.

Palavras-chave: Infecção intramamária. Resposta imune. Virulência bacteriana. *Estafilococos não-aureus* (SNA). *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

SOUZA, R.M. **Ability to resist to phagocytosis and bactericidal activity of neutrophils by distinct strains of staphylococci associated with mastitis in primiparous and multiparous cows.** [Capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos por distintas cepas de estafilococos associadas à mastite em vacas primíparas e múltíparas] 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The group of non-*aureus* staphylococci (NAS), often isolated from mammary quarters with subclinical mastitis, teat apex and environment, has ecological variability that challenges the understanding of the pathogenesis attributed to them. The species-specific factors associated with this infection have not yet been identified and the susceptibility differs between cows and quarters and promotes different infection profiles. In order to evaluate the resistance to phagocytosis and / or microbicidal activity of these pathogens, the viability, intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and blood neutrophil phagocytosis of primiparous and multiparous cows were compared to different viable isolates of staphylococci. Twelve healthy cows (six primiparous and six multiparous) were used in the middle third of lactation and 50 viable isolates of staphylococci (38 SNA and 12 *Staphylococcus aureus*) from different ecological niches. Neutrophil viability ($P = 0.55$), ROS production ($P = 0.12$) and phagocyte functional activity ($P = 0.33$) were similar among the primiparous and multiparous groups tested. However, differences ($P < 0.05$) between the different groups of species and strains of staphylococci were observed for the stimulation of intracellular ROS production by neutrophils and phagocytosis. *S. chromogenes* of different origins, ceiling apex ($P = 0.01$), transient intramammary infection ($P < 0.01$) and persistent intramammary infection ($P < 0.01$) further stimulated the production of ROS by neutrophils than species. All isolates were phagocytosed by neutrophils, but *S. chromogenes* resisted more efficiently than the other SNA species, especially *S. chromogenes* isolated from the apex of the ceiling ($P < 0.01$). *S. haemolyticus* isolated from apex to ceiling ($P = 0.02$) and transient ($P < 0.01$) intramammary infection, as well as *S. fleurettii* ($P < 0.01$), were substantially phagocytosed in the same manner as *S. aureus* isolated from nasal swab ($P = 0.03$). More evident than possible variations between mammary

responses of primiparous and multiparous is the variation between ANS. The more adapted to the breast, the greater resistance to phagocytosis.

Key words: Intramammary infection. Immune response. Bacterial virulence. Non-*aureus* staphylococci (NAS). *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A mastite se caracteriza pela complexidade em sua dinâmica de infecção e variabilidade inflamatória. A ocorrência da doença em vacas primíparas além de representar um risco para o rebanho, afeta a produção e saúde do úbere muito precocemente, impactando em toda vida produtiva desta fêmea. Além disso, a patogenia da enfermidade nessa categoria animal permanece, em grande parte, desconhecida (DE VLIEGHER et al., 2012).

Em sistemas de produção onde os patógenos primários da mastite (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e coliformes) já foram controlados por programas específicos, os estafilococos não-*aureus* (SNA) têm se tornado microrganismos emergentes e importantes causadores de infecções intramamárias (PITKÄLÄ et al., 2004; BRADLEY et al., 2007; PIEPERS et al., 2009a), principalmente, em vacas primíparas (FOX, 2009; SAMPIMON et al., 2009; DE VLIEGHER et al., 2012; DE VISSCHER et al., 2015).

Os SNA compõem um grande grupo e são considerados, genericamente, patógenos secundários, oportunistas da microbiota da pele (SUPRÉ et al., 2011; TOMAZI et al., 2015), que semelhante ao *S. aureus*, podem causar lesões mamárias que comprometem quantitativa e qualitativamente a produção de leite (TRINIDAD et al., 1990). No entanto, alguns autores descrevem a patogenicidade dos SNA como protetiva ou trivial à saúde do úbere, e que algumas espécies são amplamente encontradas no meio ambiente e raramente isoladas de amostras de leite (DE VLIEGHER et al., 2003; TAPONEN et al., 2007; SCHUKKEN et al., 2009), sugerindo a importância do estudo de estafilococos isolados de diferentes nichos ecológicos e sua relação com os mecanismos de escape do sistema de defesa do hospedeiro.

Ao atravessar o canal do teto, o microrganismo desencadeia diversos fatores solúveis e celulares que passam a atuar em defesa da glândula mamária para prevenir o estabelecimento da doença (SORDILLO & STREICHER, 2002). Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa celular (PAAPE et al., 2003; SOUZA et al., 2012), predominam nos tecidos e nas secreções mamárias no início da inflamação e podem constituir 90% do total de leucócitos na glândula. São responsáveis por fagocitar e inativar os patógenos (SORDILLO et al., 1997; PAAPE et al., 2002).

Frequentemente, as respostas inflamatórias não são suficientes para a expulsão completa dos microrganismos, o que pode estar associado a mudanças no perfil da infecção. O desequilíbrio desta interação pode ser provocado por inúmeros fatores, como a virulência dos patógenos, anergia ou hiperresponsividade do sistema imune (SORDILLO & STREICHER, 2002).

Estudos afirmam que determinados isolados de estafilococos são capazes de resistir à fagocitose e à morte por neutrófilos e macrófagos (AARESTRUP et al., 1994; AVALL-JÄÄSKELÄINEN et al., 2013). Por outro lado, autores relatam aumento da fagocitose dos estafilococos pelos neutrófilos de vacas primíparas quando comparado aos de múltiparas (MEHRZAD et al., 2009).

Pelo supracitado, fica claro que estes fatos fornecem evidências adicionais que o grupo de espécies de SNA é composto por variação substancial dentro e entre os isolados, que diferem na sua ecologia e epidemiologia (SUPRÉ et al., 2011; FRY et al., 2014). É importante conhecer o perfil de patogenicidade do agente, pois essas características podem contribuir para a cronicidade da infecção. Assim, mais estudos que avaliem estas diferenças e a relação com a resposta imune do hospedeiro são valiosos (SCHUKKEN et al., 2009).

A hipótese de diferentes SNA (quanto ao gênero, espécie e nicho) resistirem de formas diversas às funções fagocíticas já foram investigadas em macrófagos murinos (AVALL-JÄÄSKELÄINEN et al., 2013). Contudo, até onde se sabe, não existem relatos na literatura sobre esta investigação em neutrófilos bovinos. Além disto, não está claro, se essa predominância à mastite em primíparas ocorre por maior susceptibilidade das mesmas, ou por fatores inerentes aos patógenos (SUPRÉ et al., 2011; DE VLIEGHER et al., 2012; FRY et al., 2014).

Pela importância que a resposta neutrofílica dos bovinos apresenta para diferentes ambientes orgânicos, principalmente o mamário, o presente estudo objetivou avaliar a resistência à fagocitose de vacas primíparas aos principais SNA comparando tanto com *S. aureus*, quanto como com múltiparas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Ao atravessar o canal do teto o microrganismo desencadeia diversos mecanismos e mobiliza fatores solúveis e celulares que passam a atuar em defesa da glândula mamária para prevenir o estabelecimento da doença (SORDILLO & STREICHER, 2002). Os fagócitos formam a primeira linha de defesa celular (PAAPE et al., 2003; SOUZA et al., 2012) e apesar da responsabilidade na proteção da mesma atribuir-se aos neutrófilos, estes necessitam de ação prévia dos macrófagos, mantendo-se assim, a delicada inter-relação que rege os mecanismos imunes (POLITIS et al., 1992).

As células da série monócito-macrófago representam a principal população de leucócitos na glândula mamária saudável, e juntamente com as células epiteliais mamárias representam a interface entre o organismo e o meio ambiente, atuando como sentinelas e sinalizando a invasão dos patógenos, iniciando assim, a resposta inflamatória. Estas células secretam citocinas e quimiocinas que culminam na rápida migração de leucócitos do sangue, especialmente neutrófilos, para o sítio inflamatório (PAAPE et al., 2003). É importante destacar que os neutrófilos bovinos, em contraste com outras espécies animais não são atraídos diretamente pelas bactérias ou por seus produtos. Além disso, a velocidade do afluxo à glândula dependerá da intensidade desses sinais, bem como para exercer seu potencial antimicrobiano por meio de opsoninas ou antitoxinas que reconheçam o antígeno e as citocinas que o ativam (RAINARD & RIOLLET, 2003).

Uma vez no local da infecção, os neutrófilos se ligam à maioria dos microrganismos, por meio de receptores de superfície específicos, os quais reconhecem os componentes dos patógenos ou reconhecem as proteínas do hospedeiro, chamadas opsoninas, que revestem os patógenos e os torna alvo para a fagocitose. As principais opsoninas são os anticorpos da classe imunoglobulina G (IgG) que se ligam às superfícies do antígeno; os produtos de degradação da proteína C3; e as lectinas de ligação a carboidratos chamadas colectinas, que se ligam aos grupamentos de açúcares da parede celular dos microrganismos. Os neutrófilos expressam receptores para as opsoninas que facilitam a rápida fagocitose dos patógenos revestidos. Esses receptores incluem o receptor Fc para IgG (chamado de FcγRI), receptores para os fragmentos 1 e 3 do complemento (CR1 e 3) e receptores de C1q para as colectinas. A ligação das partículas

opsonizadas desencadeia o engolfamento; além disso, a ligação da IgG ao FcR e a ligação dos produtos do complemento a receptores C3 induzem ativação celular que aumenta a degradação dos microrganismos ingeridos. No engolfamento, os pseudópodes se estendem em torno do objeto, formando um vacúolo fagocítico. Então, a membrana do vacúolo se funde com a membrana de um grânulo lisossômico, resultando em liberação do conteúdo do grânulo dentro do fagolisossomo (MULLER, 2002; UNDERHILL & OZINSKY, 2002; SALLUSTO & MACKAY, 2004). A eliminação do patógeno ocorre mediante o fenômeno de explosão respiratória (*respiratory burst*) resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), entre elas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (WEBER et al., 1983; DULIN et al., 1988; MEHRZAD et al., 2001; PAAPE et al., 2002).

Devido a maior sensibilidade, o método fluorescente tem sido extremamente utilizado para monitorar a produção das ERO em células de diferentes tecidos (BUROW & VALET, 1987; KEHRER & PARADATHATHU, 1992; KOJIMA et al., 1998). Conhecido como 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) pode ser usado como marcador oxidativo tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Por ser o grupo diacetato apolar, difunde-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, o grupo diacetato é facilmente hidrolizado por esterases citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH. Este por sua vez, por ser polar, permanece no interior da célula e tornam-se excelentes substratos ao H_2O_2 gerados em excesso durante aumento do metabolismo oxidativo. Esta oxidação gera 2,7-Diclorofluoresceína, um produto intracelular altamente fluorescente (CATHCART et al., 1983; KOJIMA et al., 1998).

A fluoresceína produzida pelo DCF é diretamente proporcional à atividade do metabolismo oxidativo e parece ser mediada apenas pelo H_2O_2 (HIBARAYASHI et al., 1985; KOBZIK et al., 1990). Assim, por meio da citometria de fluxo, o ensaio com DCF pode prover a quantificação da atividade oxidativa em células individuais, mensurando a fluorescência individual (BASS et al., 1983; KOBZIK et al., 1990).

Quando geradas no metabolismo basal, as ERO não representam ameaça ao organismo, desde que um sistema produtor (sistema antioxidante) seja capaz de se opor à geração dos mesmos. Quando presentes em grandes concentrações podem induzir alterações severas em moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular (FERREIRA, 2007). Dentre os danos causados pela produção excessiva de ERO tem-se a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas,

agressão a carboidratos e ao ácido desoxirribonucleico (NETO & DONADON, 2011). Ademais, as ERO produzidas pelos fagócitos, no ambiente extracelular, podem levar a danos teciduais e celulares, como a clivagem de proteínas, que pode levar à amplificação do processo inflamatório e maior migração de polimorfonucleares (PMNL) para a glândula mamária (KOBAYASHI et al., 2003).

Grommers et al. (1989) afirmam que a severidade e duração da inflamação são proporcionais ao afluxo de leucócitos e à atividade bactericida das células somáticas no local da infecção. Se as células fagocíticas migrarem rapidamente do sangue e forem capazes de eliminar o estímulo inflamatório, o recrutamento dos leucócitos cessará, e os neutrófilos retornarão aos níveis normais. Entretanto, se os microrganismos sobreviverem à resposta imediata do hospedeiro, a inflamação continuará resultando na persistência da migração dos neutrófilos ao lúmen alveolar (SORDILLO, 2002). Embora inicialmente as lesões teciduais provocadas pelo processo inflamatório determinem aumento na permeabilidade por descontinuidade na barreira epitelial, possibilitando que os componentes imunes teciduais e sanguíneos alcancem o lúmen da glândula (RAINARD & RIOLLET, 2003) esse processo não é ininterrupto. O prolongamento da migração leucocitária, assim como, a duração e a severidade da resposta inflamatória, podem causar danos ao parênquima mamário, resultando no declínio da qualidade e quantidade de leite produzido (SORDILLO, 2002; ZHAO & LACASSE, 2008).

Portanto, a mastite é resultado da falência da complexa relação entre hospedeiro, agente e meio ambiente (CARNEIRO et al., 2009). Por isso, permanece como um dos principais desafios encontrados na exploração de bovinos de leite devido às questões que envolve de bem-estar animal, qualidade do leite e saúde pública por meio do aumento do risco de resíduos de antimicrobianos e surgimento de bactérias resistentes (ANDREW et al., 2009).

Os patógenos envolvidos na mastite possuem diversos fatores de virulência que facilitam a colonização e infecção da glândula mamária. De forma concomitante, o sistema imune do hospedeiro reage às infecções na tentativa de subverter a evasão microbiana e eliminar o agente estranho. Dentre os principais patógenos, destacam-se as bactérias do gênero estafilococos (SORDILLO & STREICHER, 2002).

O grande exemplo de estafilococos coagulase positiva é o *Staphylococcus aureus*, causador de processos infecciosos, geralmente persistentes, com aumento

expressivo da contagem de células somáticas (CCS) no leite. Possui mecanismos desenvolvidos contra os neutrófilos já bem descritos, como exemplo, a produção de cápsula antifagocítica e leucotoxinas, que atuam, respectivamente, como mecanismo de evasão à fagocitose ou indução de apoptose precoce (O'RIORDAN & LEE, 2004).

Por outro lado, os SNA são considerados patógenos secundários, com baixa patogenicidade e frequentemente são isolados de casos de mastite subclínica em vacas primíparas (PYÖRÄLÄ & TAPONEN, 2009). Apesar da mastite em novilhas já ser descrita há décadas (SCHALM, 1942), só foi considerada importante nos últimos anos (MAKOVEC & RUEGG, 2003; PITKÄLÄ et al., 2004; FOX, 2009; SAMPIMON et al., 2009; DE VLIEGHER et al., 2012; DE VISSCHER et al., 2015). O aumento da importância da doença nesta categoria animal, fomentou estudos sobre a resposta imune da glândula mamária e dos patógenos predominantes em novilhas (MEHRZAD et al., 2009; DE VLIEGHER et al., 2012). O fato de primíparas e multíparas serem mantidas no mesmo sistema de produção, sob os mesmos desafios e apresentarem perfis infecciosos distintos, estabeleceu a hipótese de primíparas e multíparas possuírem diferentes interações patógeno-hospedeiro (VAN WERNEN et al., 1997; BURVENICH et al., 2003).

O desenvolvimento da glândula mamária em novilhas é contínuo, por toda lactação (TUCKER, 1987) e a infecção pré e pós-parto pode prejudicar esse processo, resultando em produção abaixo do esperado durante a primeira lactação (DE VLIEGHER et al., 2005b). A prevalência das infecções intramamárias subclínicas em vacas primíparas é muito variável. No pré parto, a prevalência de quartos mamários infectados de novilhas pode variar entre 29 a 75%, ao passo que, no pós-parto imediato, essa variação diminui para 12 a 57%. O denominador comum em todos os estudos é a alta proporção de infecções causadas pelos SNA, que podem persistir durante toda a lactação (PIESSENS et al., 2011; SUPRÉ et al., 2011).

De fato, primíparas com baixa CCS no início da lactação, produzem mais leite do que aquelas com alta CCS (COFFEY et al., 1986; DE VLIEGHER et al., 2005b). Porém, Kirk et al. (1996), assim como, Schukken et al. (2009), afirmaram que, infecções intramamárias causadas pelos SNA não interferiram na produção desta categoria animal. Pelo contrário, a produção de leite foi maior em primíparas infectadas do que não infectadas (COMPTON et al., 2007a, PIEPERS et al.,

2009a). Acredita-se que estes agentes possam prevenir as infecções causadas por outros agentes mais patogênicos, os chamados patógenos principais, diminuindo assim, a chance do desenvolvimento clínico da doença (SCHUKKEN et al., 2009).

Apesar da mastite clínica ser mais comum em multíparas, o período pós-parto das primíparas, principalmente nas duas primeiras semanas de lactação, é marcado pela alta incidência (maior que 30%) deste tipo de manifestação (BARKEMA et al., 1998b; NYMAN et al., 2007; OLDE RIEKERINK et al., 2008) devido à diminuição da função dos neutrófilos sanguíneos durante o período de transição (HOEBEN et al., 2000; BURVENICH et al., 2003; MEHRZAD et al., 2005). A mastite clínica em primíparas é predominantemente local (BURVENICH et al., 2003; VANGROENWEGHE et al., 2004) e apesar da disfunção neutrofílica inicial, os mesmos tendem a produzir mais ERO do que os neutrófilos de multíparas (HEYNEMAN et al., 1990; MEHRZAD et al., 2005).

A ocorrência de SNA, em novilhas, no pré e pós-parto, está em parte correlacionada à presença destes na microbiota da pele e mucosa, assim como, na colonização do esfíncter e canal do teto (TRINIDAD et al., 1990). A grande maioria dos pesquisadores não classifica os SNA como agentes ambientais ou contagiosos, designando-os como "flora oportunista da pele do teto", que podem ter acesso ao interior da glândula mamária (SAMPIMON, et al., 2009).

Mais de 20 espécies diferentes de SNA já foram isoladas do leite (VANDERHAEGHEN et al., 2014). No entanto, os SNA abrangem uma ampla gama de habitats, que variam de espécies essencialmente ambientais para as espécies adaptadas ao hospedeiro, como *Staphylococcus chromogenes*, encontrado também no ápice, canal do teto (DE VLIEGHER et al., 2003; DE VISSCHER et al., 2016), e em outros locais extra-mamários do corpo (TAPONEN et al., 2008). *S. chromogenes* causa infecções intramamárias (SAMPIMON et al., 2009; PARK et al., 2011) e induz aumento leve a moderado da CCS (TOMAZI et al., 2015), embora um estudo tenha notado aumento significativo comparável a infecções por *S. aureus* (SUPRÉ et al., 2011).

Enquanto isso, outras espécies como, *S. fleurettii*, *S. equorum* e *S. sciuri* (DE VISSCHER et al., 2014), raramente isoladas do leite, ou seja, que não estão associadas às infecções intramamárias, são comumente encontradas no ambiente, como ar, areia, maravalha e chão ripado (PIESSENS et al., 2011). E por fim,

espécies como, *S. haemolyticus* e *S. simulans* são isoladas tanto do ambiente, como de quartos infectados (PIESSENS et al., 2011).

Considera-se um rebanho com problema de mastite em vacas primíparas aquele que apresenta mais de 15% com mastite clínica no pós-parto ou mais de 15% de todas as primíparas com CCS $> 1,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ entre o 10º e 35º dia de lactação (DE VLIEGHER et al., 2003). Esses dados justificam a adoção de medidas preventivas e de controle especiais para as novilhas no pré e pós-parto, que devem ser aplicadas por todas as fazendas (DE VLIEGHER et al., 2012).

- 1) Gestão da saúde do úbere: acompanhamento pela CCS e exames microbiológicos (LAFFRANCHI et al., 2001);
- 2) Criação de bezerras: uso de instalações limpas e individuais durante a fase de aleitamento para evitar a mamada cruzada (DE VLIEGHER et al., 2012);
- 3) Controle efetivo contra as moscas: *Haematobia irritans* (mosca dos chifres) demonstraram transmitir *S. aureus* (OWENS et al., 1998; ROBERSON et al., 1998);
- 4) Pré parto: manter as novilhas em ambiente limpo e separadas das multíparas. Reduzir a incidência de edema de úbere, otimizando o manejo durante o pré parto, principalmente a dieta (NYMAN et al., 2009);
- 5) Nutrição: minimizar o risco do balanço energético negativo durante o período de transição adequando a dieta das novilhas. Avaliar o manejo nutricional, evitando qualquer tipo de deficiência mineral. Selênio e vitamina E melhoram a atividade fagocítica de neutrófilos, diminuindo o risco de mastite clínica (WEISS et al., 1990; BARKEMA et al., 1998b);
- 6) Bem-estar: minimizar o estresse sofrido pelo animal próximo/durante o parto. Ordenhar corretamente os animais evitando qualquer tipo de situação estressante (COMPTON et al., 2007a);
- 7) Considerar o uso de selante interno durante o pré-parto, onde o risco de mastite clínica por agentes ambientais é maior (PARKER et al., 2008);
- 8) Antibioticoterapia durante o pré parto: sempre com auxílio do Médico Veterinário para a escolha do antimicrobiano correto baseado no antibiograma e realizar testes de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite antes da coleta pelo laticínio (KREIGER et al., 2007; BRYAN & TAYLOR, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em 11 de fevereiro de 2016, protocolado sob o nº 8801080715.

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Para o presente estudo foram utilizadas 12 cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica persistente (n=6) e de fossas nasais de bovinos leiteiros (nicho extramamário) (n=6), provenientes do banco de bactérias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Além disso, foram utilizadas 38 cepas distintas de SNA oriundas do banco de bactérias da Faculdade de Medicina Veterinária de Gent (*Faculty of Veterinary Medicine – Ghent University*), a saber: *S. chromogenes* (n=5 – ápice do teto; n=5 – Infecção intramamárias (IIM) transiente; n=5 – IIM persistente), *S. haemolyticus* (n=5 – ápice do teto; n=5 – IIM transiente) e *S. fleurettii* (n=5 – IIM transiente; n=8 – ambiente) (Apêndice A).

3.2 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Os isolados bacterianos (n=50) foram cultivados, de forma asséptica, em fluxo laminar, em placas de Petri contendo ágar BHI¹ por 24 horas em estufa a 37 °C. Posteriormente, três colônias frescas foram retiradas de cada placa e cultivadas em caldo BHI por 18 horas a 37 °C. Subsequentemente, 3,0 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de caldo BHI² e incubados a 37 °C em diferentes tempos (três, seis, nove, 12 e 24 horas). Após diferentes e crescentes períodos de incubação, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada tubo para estimar a concentração bacteriana. Para caracterização da curva de crescimento, a quantificação celular foi estimada por meio da espectrofotometria, na qual avaliou-se a densidade óptica com comprimento de onda de 600 nanômetros (nm). O ensaio foi realizado em triplicata e a

¹ Brain Heart Infusion Agar – Ágar Cérebro Coração – Acumedia® (Nº cat. 7115, EUA)

² Brain Heart Infusion Broth – Caldo Cérebro Coração – Acumedia® (Nº cat. 7116, EUA)

concentração final de bactérias, para cada ponto da curva de crescimento, é resultante do valor médio da absorbância dos três valores obtidos.

3.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO PARA ENSAIO DE PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Os isolados bacterianos foram cultivados de forma asséptica em fluxo laminar, em placas de ágar BHI por 24 horas em estufa a 37 °C. Posteriormente, três colônias frescas foram retiradas de cada placa e cultivadas em caldo BHI por 18 horas a 37 °C. Subsequentemente, 15 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo cônico tipo falcon contendo 15 mL de caldo BHI e incubados a 37 °C por 18 horas. Após o crescimento, o caldo bacteriano foi centrifugado³ a 10.000 X g durante 10 minutos e submetido a duas lavagens com PBS⁴ diluído estéril (Anexo A). O crescimento bacteriano foi estimado pela densidade óptica e determinado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) por diluição seriada. Para o inóculo do ensaio de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, utilizou-se bactérias sem marcação, com intuito de evitar sobreposição dos espectros de emissão na citometria de fluxo.

3.4 MARCAÇÃO BACTERIANA COM CFSE (*5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester*) E PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO PARA O ENSAIO DE FAGOCITOSE

Conforme proposto por Vander Top et al. (2006), no qual é possível avaliar a fagocitose de bactérias viáveis, adicionou-se ao inóculo o equivalente a 2,0 µM da solução de CFSE⁵ e o mesmo foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, o caldo bacteriano foi centrifugado a 10.000 X g durante 10 minutos, submetido a três lavagens e ressuspendido com PBS estéril. O crescimento também foi determinado pela densidade óptica, da mesma maneira da pré marcação. Para assegurar a viabilidade dos isolados, 10 µL de cada cepa foram

³ Sorvall Legend XTR Centrifuge – Thermo Scientific® (EUA)

⁴ *Phosphate Buffered Saline* – Tampão Fosfato Salino

⁵ *5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester* – Santa Cruz® (Nº cat. SC-202096, EUA)

dispensados em placas de Petri com meio ágar sangue⁶, semeados e incubados a 37 °C por 24 horas, antes e depois da marcação.

3.5 ANIMAIS UTILIZADOS

Para o presente estudo os animais deviam atender aos seguintes critérios de inclusão amostral: 1) clinicamente saudável, sem sinais clínicos evidentes de doenças infecto-contagiosas ou metabólicas; 2) ausência de secreções anormais no teste da caneca de fundo escuro de todos os quartos; 3) todos os quartos mamários com CCS < 2×10^5 células mL⁻¹, limiar de CCS proposto por Schepers et al. (1997) e Schukken et al. (2003) para quartos mamários não infectados; 4) resultados negativos no exame bacteriológico de todos os quartos; e 5) apresentar dias em lactação (DEL) acima de 21 dias. Foram utilizadas doze vacas em lactação sadias (seis primíparas e seis multíparas), da raça Holandesa, provenientes do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) da FMVZ-USP – *Campus Pirassununga*. Os animais eram alojados individualmente, em instalação do tipo *free stall* e recebiam alimentação balanceada de acordo com o nível de exigência.

3.5.1 COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite foram colhidas em duas alíquotas: a primeira destinada para o exame bacteriológico e a segunda para CCS automática. Desprezou-se de cada quarto mamário os três primeiros jatos de leite na caneca de fundo escuro, observando-se cor, consistência e presença de massas ou grumos. Em seguida, foi realizada a higienização do úbere por meio da imersão de cada teto em solução anti séptica e a secagem com papel toalha individual.

3.5.1.1 EXAME BACTERIOLÓGICO

Para o exame bacteriológico foi realizada a antissepsia do teto de acordo com o *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). As amostras de leite foram coletadas e acondicionadas em frascos com tampa devidamente esterilizados e congeladas até o momento das análises. A pesquisa de microrganismos foi

⁶ *Blood Agar Base* – Ágar Sangue Base – Kasvi® (Nº cat. K25-610005, Brasil)

realizada, de acordo com Hogan et al. (2005), pelo Laboratório Vida Vet, em Botucatu – SP, laboratório de referência credenciado junto ao MAPA.

3.5.1.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS AUTOMÁTICA)

As amostras de leite foram colhidas em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, acondicionadas em caixas específicas e transportadas para o Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Clínica do leite (ESALQ-USP) em Piracicaba – SP, laboratório de referência credenciado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a quantificação automática das células somáticas. A contagem foi realizada por citometria de fluxo em equipamento opto eletrônico⁷ definido como método de rotina para determinação da CCS. Os resultados foram expressos em células somáticas por mililitro de leite (CS/mL).

Após a colheita das amostras de leite, os animais foram ordenhados e em seguida, as amostras de sangue foram colhidas.

3.5.2 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

A coleta de sangue venoso foi realizada por punção da veia jugular externa, com antissepsia prévia, utilizando sistema a vácuo⁸ em tubos com anticoagulante (EDTA⁹ e heparina) e sem anticoagulante. De cada vaca, foram coletados aproximadamente 120 mL de sangue periférico.

3.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

3.6.1 HEMOGRAMA

⁷ Somacount 300 – Bentley Instruments® (EUA)

⁸ Sistema Vacutainer – Becton Dickinson™ (EUA)

⁹ *Ethylenediamine tetraacetic acid* – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

O eritrograma e o leucograma foram realizados em equipamento de automação total¹⁰. Além disso, o leucograma foi resultado da contagem diferencial, feita por esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Rosenfeld (1947), ao microscópio óptico (aumento de 100x) identificados e contados 100 leucócitos (BIRGEL, 1982).

3.6.2 VIABILIDADE NEUTROFÍLICA

No ensaio para a avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos empregou-se a Anexina V-FITC¹¹ e o iodeto de propídeo (PI), seguindo as técnicas propostas por Vermes et al., (2000). Foram adicionados 100 µL de sangue total de cada animal em todos os tubos de polipropileno. Em seguida, foi realizada lise hipotônica seguida da centrifugação¹² a 1.200 rotações por minuto (rpm) por oito minutos. Após este procedimento ter sido repetido, adicionou-se 1.000 µL da solução de tampão de ligação (Anexo B) e os mesmos foram novamente centrifugados. Uma vez centrifugados, desprezou-se o sobrenadante, homogeneizou-se os tubos e adicionou-se 1 µL de Anexina V-FITC. As amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luminosidade. Posteriormente, foram adicionados aos tubos 1.000 µL da solução de tampão de ligação para subsequente centrifugação a 1.200 rpm por oito minutos. Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 100 µL da solução de tampão de ligação juntamente com os respectivos anticorpos de acordo com o protocolo descrito no quadro 1. Adicionou-se 1 µL do anticorpo monoclonal primário¹³ e incubou-se os tubos em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1.000 µL da solução de tampão de ligação e procedeu-se nova centrifugação. Realizou-se a ressuspensão em 100 µL da solução de tampão de ligação e adicionou-se 1 µL do anticorpo secundário¹⁴, incubando-se por 30 minutos em temperatura ambiente sob a ausência de luminosidade para subsequentemente adicionar 1.000 µL da solução de tampão de ligação em cada tubo e centrifugar. No final, procedeu-se mais uma lavagem e as amostras foram ressuspensas em 300 µL da solução de tampão de ligação

¹⁰ Advia2120i – Hematology System – Siemens® (EUA)

¹¹ *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* – Becton Dickinson™ (Nº cat. 556547, EUA)

¹² Sorvall RT7 Centrifuge – Thermo Scientific® (EUA)

¹³ VMRD – Pullman® (Nº cat. WA99164, EUA)

¹⁴ R&D Systems® (Nº cat. 55413, EUA)

Quadro 1 - Protocolo para realização do ensaio de viabilidade celular das amostras de sangue de vacas primíparas e multíparas em terço médio de lactação – São Paulo – 2017

CALIBRAÇÃO		
Tubo	Quantidade	Conteúdo
A	1	Células
B	1	Células + Anexina V-FITC
C	1	Células + PI
D	1	Células + CH138-IgM + IgM-APC
EXPERIMENTO		
Tubo	Quantidade	Conteúdo
E	12	Células + Anexina V-FITC+ PI + CH138-IgM + IgM-APC

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: FITC – Isiotionato de fluoresceína; PI – Iodeto de Propídeo; APC – Alofococianina

3.6.3 FAGOCITOSE E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Na avaliação funcional dos fagócitos, por meio da fagocitose dos isolados bacterianos pelos neutrófilos, os procedimentos foram conduzidos segundo as técnicas empregadas por Hasui et al. (1989). De acordo com o quadro 2, foi adicionado 100 µL de sangue total de cada animal em todos os tubos de polipropileno. Nos tubos E e F adicionou-se 700 µL de PBS gelado e 200 µL de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)¹⁵. Nos mesmos tubos F adicionou-se, também, os isolados bacterianos não marcados (MOI 25:1 bactérias:célula – Apêndice B). Nos tubos G adicionou-se 900 µL de PBS gelado e os isolados bacterianos marcados com CFSE (MOI 25:1 bactérias:célula – Apêndice C). E por fim, nos tubos H, adicionou-se 800 µL de PBS gelado, 100 µL de soro sanguíneo (do respectivo animal) aquecido a 56 °C por 30 minutos e os isolados bacterianos marcados com CFSE (MOI 25:1 bactérias:célula – Apêndice C). Incubou-se¹⁶ todos os tubos a 37 °C por 30 minutos. Depois da incubação, foi adicionado, em cada tubo, 2 mL de EDTA (3 mM)¹⁷ e os mesmos foram centrifugados por oito minutos a 1.200 rpm. Desprezou-se o sobrenadante, homogeneizou-se os tubos e realizou-se a lise hipotônica seguida da centrifugação a 1.200 rpm por oito minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Desprezou-se o sobrenadante, homogeneizou-se os tubos, adicionou-se 1 mL de

¹⁵ Sigma-Aldrich® (Nº cat. D6883, EUA)

¹⁶ Banho Maria – Modelo 102 – Primar® (Brasil)

¹⁷ Sigma-Aldrich® (Nº cat. E5134, EUA)

PBS gelado e os mesmos foram centrifugados novamente. Por fim, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 μ L de PBS + BSA 0,1%¹⁸ gelado em cada tubo.

Quadro 2 - Protocolo para quantificação da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) das amostras de sangue, de vacas primíparas e múltiparas em terço médio de lactação, frente às distintas cepas de estafilococos – São Paulo – 2017

CALIBRAÇÃO			
Tubo	Qtde.	Conteúdo	
A	1	Células	
B1.1	1	Células + isolado bacteriano (SNA) incubado a 37 °C	
B1.2	1	Células + isolado bacteriano (<i>S. aureus</i>) incubado a 37 °C	
B2.1	1	Células + isolado bacteriano marcado (SNA) incubado a 4 °C	
B2.2	1	Células + isolado bacteriano marcado (<i>S. aureus</i>) incubado a 4 °C	
C	1	Células + DCFH	
EXPERIMENTO			
Tubo	Qtde.	Conteúdo	Ensaio
E	12	Células + DCFH	ERO
F	600	Células + DCFH + isolados bacterianos não marcados	ERO
G	600	Células + isolados bacterianos marcados	Fagocitose
H	600	Células + isolados bacterianos marcados opsonizados	Fagocitose

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: Qtde. – Quantidade; SNA – Estafilococos não-*aureus*; DCFH - 2',7' diclorodihidroflurosceína diacetato; ERO – Espécies reativas de oxigênio

3.6.4 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO

As leituras das amostras de sangue foram realizadas em citômetro de fluxo¹⁹. Os eventos foram adquiridos utilizando o programa CellQuest²⁰, por meio da dispersão de luz estabelecida para permitir a inclusão das células de interesse com base no tamanho – *forward scatter* (FSC) e granulosidade – *side scatter* (SSC). O *software* FlowJo²¹ foi utilizado para análise dos 20.000 eventos adquiridos, no *gate* de granulócitos, de cada amostra.

3.6.4.1 VIABILIDADE NEUTROFÍLICA

Primeiramente foi desenhado o *gate* da população de granulócitos com base no FSC e SSC (RAIDAL et al., 1998; BATISTA et al., 2015). Da mesma população, foi avaliada a porcentagem de células que expressaram CH138. E por fim, atividade funcional foi analisada dentro da população especificada (Figura 1).

¹⁸ Albumina Bovina fração V – Inlab® (Nº cat. 1870, Brasil)

¹⁹ FACSCalibur™ – Bectan Dickinson Immunocytometry Systems™, San Diego, EUA.

²⁰ Bectan Dickinson Immunocytometry Systems™

²¹ Treestar Inc., San Carlos, EUA – Versão para Windows 7.2.5

Figura 1 - 1) Identificação da população de granulócitos do sangue de uma vaca primípara (*gate*); 2) Identificação da população de granulócitos sanguíneos (99,6%) expressando CH138; 3) Granulócitos sanguíneos expressando CH138 que estão viáveis (Q1 – células que morreram por apoptose (0,013%): anexina positivas/PI negativas; Q2 – células que morreram por apoptose e/ou necrose (0,17%): anexina positivas/PI positivas; Q3 – células que morreram por necrose (2,62%): anexina negativas/PI positivas; Q4 – células viáveis (97,2%): anexina negativas/PI negativas) – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017)

3.6.4.2 PRODUÇÃO DE ERO E FAGOCITOSE

Primeiramente foi desenhado o *gate* da população de granulócitos com base no FSC e SSC (RAIDAL et al., 1998; BATISTA et al., 2015). Da mesma população, foi avaliada a porcentagem de neutrófilos que produziram ERO quando estimulados ou não (basal) pelas diferentes cepas de estafilococos (Figura 2); e foi avaliada a porcentagem de neutrófilos que fagocitaram as diferentes cepas de estafilococos opsonizadas ou não (Figura 3).

Figura 2 - 1) Identificação da população de granulócitos do sangue de uma vaca primípara (*gate*); 2) Identificação da população de granulócitos sanguíneos que produziram ERO quando estimulados (verde) e não estimulados (basal) (cinza) pelos estafilococos – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017)

Figura 3 - 1) Identificação da população de granulócitos do sangue de uma vaca primípara (*gate*); 2) Identificação da população de granulócitos sanguíneos que fagocitaram (verde) ou não (cinza) determinada cepa de estafilococo opsonizada – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017)

3.6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados e variáveis independentes foram transformadas em distribuição normal seguindo uma abordagem em duas etapas. Um primeiro passo envolveu transformar a variável em uma classificação percentil, o que resultou em probabilidades uniformemente distribuídas. O segundo passo aplicou a transformação inverso-normal aos resultados do primeiro passo para formar uma variável consistindo em pontuações Z normalmente distribuídas. A média e o desvio padrão da variável original foram mantidos para melhorar a interpretação dos resultados. Os resultados da viabilidade e da resposta imune dos neutrófilos foram avaliados por modelo de regressão misto considerando os animais como efeito randômico. Os isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias persistentes foram considerados como referência. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo. Os resultados estão apresentados como média + erro-padrão.

4 RESULTADOS

Os resultados das técnicas realizadas com os isolados bacterianos, assim como, as análises imunológicas do sangue estão apresentadas em tabelas e gráficos a seguir.

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

4.1.1 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A média e o desvio padrão da absorbância mensurada em cada momento, nos dois diferentes grupos de estafilococos, estão expressos na tabela 1. É possível observar a ordem crescente dos valores, que caracteriza as fases iniciais da curva de crescimento bacteriano (fase lag/adaptação e fase log/exponencial). Dois gráficos que representam a curva de crescimento de isolados distintos foram incluídos (Gráficos 1 e 2).

Tabela 1 - Média e desvio padrão do crescimento dos isolados bacterianos durante os cinco momentos de leitura da absorbância para elaboração da curva – São Paulo – 2017

CRESCIMENTO BACTERIANO			
Tempo (horas)	SNA	<i>S. aureus</i>	Total
3	0,04±0,02	0,03±0,02	0,04±0,02
6	0,08±0,04	0,11±0,05	0,09±0,04
9	0,14±0,08	0,25±0,13	0,16±0,10
12	0,19±0,11	0,32±0,15	0,22±0,13
24	0,30±0,10	0,48±0,21	0,34±0,15

Legenda: SNA – Estafilococos não-*aureus*
 Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Gráfico 1 - Curva de crescimento do *S. chromogenes* (9), isolado de caso de mastite transiente – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Gráfico 2 - Curva de crescimento do *S. aureus* (45), isolado de caso de mastite persistente – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Diante de tais resultados, optou-se por utilizar o período de incubação de 18 e 12 horas para os *SNA* e *S. aureus*, respectivamente, com o intuito de trabalhar com isolados bacterianos na fase exponencial tardia de crescimento, início da fase estacionária.

4.1.2 MARCAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS COM CFSE

Com o objetivo de trabalhar com isolados bacterianos viáveis para o ensaio de fagocitose, foi necessário a padronização da marcação bacteriana e, posteriormente, o preparo do inóculo. A confirmação da conjugação dos isolados bacterianos com o CFSE foi mediante a ensaios realizados por citometria de fluxo. A tabela 2 demonstra a média e o desvio padrão da intensidade de fluorescência das bactérias, dos dois diferentes grupos, antes (branco) e após a marcação.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da porcentagem da intensidade de fluorescência de isolados bacterianos antes (branco) e após a marcação com CFSE – São Paulo – 2017
MARCAÇÃO BACTERIANA COM CSFE (%)

Bactérias	SNA	<i>S. aureus</i>	Total
Branco	0,22±0,30	0,62±0,73	0,32±0,46
CFSE	94,27±4,50	95,41±2,20	94,54±4,07
CFSE/Branco	7,90±6,05	9,80±5,17	8,40±5,86

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: CFSE - 5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester; SNA – *Estafilococos não-aureus*

Ao analisar a tabela 2, percebemos que os isolados bacterianos foram marcados com sucesso (94,54%). A intensidade de fluorescência foi 8,4 vezes maior, em média, ao compararmos as bactérias antes e após a marcação. Este aumento foi determinado pela média geométrica de intensidade de fluorescência (GMFI) da bactéria marcada com CFSE dividida pela GMFI da bactéria não marcada. A figura 1 representa histogramas que ilustram a diferença da intensidade de fluorescência de duas bactérias quando conjugadas ao CFSE pela citometria de fluxo.

Figura 1 - Demonstração da intensidade de fluorescência da bactéria *S. chromogenes* (9) não conjugada ao CFSE (à esquerda em cinza) e conjugada ao CFSE (à direita em verde) verificada pela citometria de fluxo – São Paulo – 2017

Demonstração da intensidade de fluorescência da bactéria *S. aureus* (48) não conjugada ao CFSE (à esquerda em cinza) e conjugada ao CFSE (à direita em verde) verificada pela citometria de fluxo – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

4.1.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO AMOSTRAL

A tabela 3 compara os valores da média e erro padrão de neutrófilos e CCS entre vacas primíparas e multíparas. Estes parâmetros foram utilizados como critérios de inclusão amostral.

Tabela 3 - Comparação do número de leucócitos, neutrófilos e CCS entre vacas primíparas e multíparas em terço médio de lactação – São Paulo – 2017

Parâmetros	Primíparas	Multíparas	Total
Neutrófilos (/mm³)	3.696,80±30,85	2.663,70±36,84	3.180,30±35,23
CCS (cél./µL)	21,33±3,55	56,92±8,80	39,13±7,49

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

4.2 VIABILIDADE NEUTROFÍLICA

Na tabela 4 estão representados a média e desvio padrão da viabilidade de neutrófilos sanguíneos (CH138⁺) de vacas primíparas e multíparas em terço médio de lactação.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da viabilidade (anexina V-FITC e iodeto de propídeo negativos) de neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas em terço médio de lactação – São Paulo – 2017

VIABILIDADE NEUTROFÍLICA		
Primíparas	Multíparas	Total
97,75±1,74	97,96±1,60	97,85±1,53

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Quando analisados os dados da viabilidade celular, pôde-se perceber que não houve diferença ($P = 0,55$) entre vacas primíparas e multíparas.

4.3 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) POR NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS

A tabela 5 representa a média e o erro padrão de neutrófilos de vacas primíparas e multíparas que produziram ERO quando não estimulados (basal) ou estimulados por isolados bacterianos de diferentes origens, assim como, a média geométrica da intensidade de fluorescência desta produção.

Tabela 5 - Média e erro padrão da porcentagem de neutrófilos sanguíneos que produziram espécies reativas de oxigênio (ERO), quando não estimulados (basal) ou estimulados por isolados de estafilococos de origens distintas e a média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) desta produção – São Paulo – 2017

Grupo de bactérias	ERO			
	%		GMFI	
	Primíparas	Multíparas	Primíparas	Multíparas
Basal	98,7 $\pm$ 1,1	95,4 $\pm$ 2,0	709,6 $\pm$ 27,5	266,4 $\pm$ 15,6
<i>S. chromogenes</i> AT	96,7 $\pm$ 2,1	97,4 $\pm$ 1,6	1.030,8 $\pm$ 30,5	339,1 $\pm$ 16,2
<i>S. chromogenes</i> IIM T	98,8 $\pm$ 1,0	97,5 $\pm$ 1,5	818,3 $\pm$ 27,7	292,9 $\pm$ 16,6
<i>S. chromogenes</i> IIM P	98,1 $\pm$ 1,5	97,5 $\pm$ 2,2	923,5 $\pm$ 29,3	274,2 $\pm$ 13,7
<i>S. haemolyticus</i> AT	97,1 $\pm$ 2,4	96,8 $\pm$ 1,8	880,9 $\pm$ 28,0	307,3 $\pm$ 17,4
<i>S. haemolyticus</i> IIM T	95,2 $\pm$ 2,8	94,7 $\pm$ 2,5	818,8 $\pm$ 26,7	362,3 $\pm$ 18,5
<i>S. fleurettii</i> IIM T	96,6 $\pm$ 2,4	95,2 $\pm$ 2,2	702,2 $\pm$ 24,8	337,4 $\pm$ 18,5
<i>S. fleurettii</i> A	98,6 $\pm$ 1,1	95,2 $\pm$ 2,1	765,4 $\pm$ 26,3	301,0 $\pm$ 17,7
<i>S. aureus</i> SN	98,1 $\pm$ 1,8	95,5 $\pm$ 2,0	849,2 $\pm$ 29,6	293,1 $\pm$ 15,0
<i>S. aureus</i> IIM P	98,1 $\pm$ 1,7	94,0 $\pm$ 2,3	808,1 $\pm$ 27,9	278,9 $\pm$ 14,1

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: ERO – Espécie reativa de oxigênio; % – Porcentagem; GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência; AT – Ápice do teto; IIM – Infecção intramamária; T – Transiente; P – Persistente; A – Ambiente; SN – Suabe nasal

Com base nos resultados da tabela 5, comparando vacas primíparas e multíparas, foi constatado que não houve diferença na porcentagem de produção de ERO ($P = 0,12$), bem como, na GMFI ($P = 0,24$) pelos neutrófilos sanguíneos quando não estimulados (basal) ou estimulados por estafilococos de diferentes origens.

A tabela 6 representa a média e o erro padrão da capacidade produção de ERO por neutrófilos sanguíneos quando não estimulados (basal) ou estimulados por isolados bacterianos de diferentes origens, assim como, a intensidade de fluorescência desta produção.

Tabela 6 - Média e erro padrão da porcentagem de neutrófilos sanguíneos que produziram espécies reativas de oxigênio (ERO), quando estimulados ou não (basal) por estafilococos de origens distintas e a média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) – São Paulo – 2017

ERO		
Grupo de bactérias	%	GMFI
Basal	97,1 $\pm$ 1,8	488,0 $\pm$ 24,2 ^c
<i>S. chromogenes</i> AT	97,0 $\pm$ 1,9 ^a	690,8 $\pm$ 27,2 ^a
<i>S. chromogenes</i> IIM T	98,1 $\pm$ 1,4 ^a	551,1 $\pm$ 25,0
<i>S. chromogenes</i> IIM P	97,8 $\pm$ 1,5 ^a	598,8 $\pm$ 26,4 ^a
<i>S. haemolyticus</i> AT	97,0 $\pm$ 2,1	594,1 $\pm$ 25,6
<i>S. haemolyticus</i> IIM T	94,9 $\pm$ 2,7	590,5 $\pm$ 24,5 ^a
<i>S. fleurettii</i> IIM T	95,9 $\pm$ 2,3	519,8 $\pm$ 22,9
<i>S. fleurettii</i> A	96,9 $\pm$ 1,9	533,2 $\pm$ 24,1
<i>S. aureus</i> SN	96,8 $\pm$ 1,9	571,1 $\pm$ 26,3
<i>S. aureus</i> IIM P	96,0 $\pm$ 2,2 ^b	539,8 $\pm$ 24,9 ^b

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: ERO – Espécie reativa de oxigênio; % – Porcentagem; GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência; AT – Ápice do teto; IIM – Infecção intramamária; T – Transiente; P – Persistente; A – Ambiente; SN – Suabe nasal

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados bacterianos

*O grupo *S. aureus* IIM P foi considerado padrão (controle)

Observando os resultados da tabela 6, houve diferença entre os grupos de bactérias. *S. chromogenes* isolados de infecção intramamária transiente ($P < 0,01$), *S. chromogenes* isolados de infecção intramamária persistente ($P < 0,01$) e *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P = 0,01$), estimularam maior produção de ERO pelos neutrófilos quando comparado ao padrão (*S. aureus* isolados de infecção intramamária persistente). A GMFI produzida pelos neutrófilos quando estimulados pelos *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0,01$), *S. chromogenes* isolados de infecção intramamária persistente ($P = 0,01$) e *S. haemolyticus* isolados de infecção intramamária transiente ($P \leq 0,05$) foi maior do que quando estimulado pelos *S. aureus* isolados de infecção intramamárias persistente, que por sua vez, foi maior que o basal ($P \leq 0,05$).

O gráfico 3 representa a média e o erro padrão da intensidade de fluorescência da produção de ERO por neutrófilos sanguíneos quando não estimulados (basal) ou estimulados por isolados bacterianos de diferentes origens.

Gráfico 3 – Média e erro padrão da intensidade de fluorescência da produção de ERO por neutrófilos sanguíneos não estimulados (basal) ou estimulados pelos estafilococos de origens distintas – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: ERO – Espécie reativa de oxigênio; GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência; AT – Ápice do teto; IIM – Infecção intramamária; T – Transiente; P – Persistente; A – Ambiente; SN – Suabe nasal

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados bacterianos

*O grupo *S. aureus* IIM P foi considerado padrão (controle).

Barras representam o erro padrão da média

4.5 FAGOCITOSE POR NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS

Na tabela 7 estão dispostos os valores das médias e erro padrão dos neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas que fagocitaram distintos estafilococos opsonizados ou não opsonizados e a média geométrica da intensidade de fluorescência da fagocitose.

Tabela 7 - Média e erro padrão de neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas que fagocitaram distintos isolados de estafilococos opsonizados e não opsonizados, em porcentagem, e a média geométrica da intensidade de fluorescência da fagocitose – São Paulo – 2017

Fagocitose								
G	%				GMFI			
	Primíparas		Multíparas		Primíparas		Multíparas	
	N. Ops.	Ops.	N. Ops.	Ops.	N. Ops.	Ops.	N. Ops.	Ops.
1	7,5 $\pm$ 2,8	7,0 $\pm$ 2,8	0,6 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 2,8	25,8 $\pm$ 3,9	23,3 $\pm$ 4,2	21,4 $\pm$ 4,7	18,6 $\pm$ 4,3
2	11,5 $\pm$ 3,5	13,7 $\pm$ 4,3	3,3 $\pm$ 3,0	6,1 $\pm$ 3,6	32,3 $\pm$ 5,5	88,8 $\pm$ 17,5	28,7 $\pm$ 5,4	33,4 $\pm$ 5,5
3	12,4 $\pm$ 3,8	15,5 $\pm$ 4,5	3,0 $\pm$ 2,6	5,2 $\pm$ 3,4	27,8 $\pm$ 4,3	32,9 $\pm$ 4,5	32,3 $\pm$ 5,1	30,1 $\pm$ 5,5
4	22,6 $\pm$ 5,3	24,1 $\pm$ 5,2	11,5 $\pm$ 4,5	12,7 $\pm$ 4,8	84,9 $\pm$ 12,5	119,6 $\pm$ 16,4	83,6 $\pm$ 11,1	70,6 $\pm$ 10,3
5	24,6 $\pm$ 5,3	26,4 $\pm$ 5,4	17,6 $\pm$ 5,3	16,8 $\pm$ 5,0	63,8 $\pm$ 8,2	96,2 $\pm$ 11,9	93,5 $\pm$ 11,8	75,9 $\pm$ 10,6
6	16,8 $\pm$ 5,3	23,5 $\pm$ 5,5	11,8 $\pm$ 4,0	13,5 $\pm$ 4,2	80,5 $\pm$ 11,7	98,2 $\pm$ 12,9	97,4 $\pm$ 14,0	75,4 $\pm$ 11,0
7	16,0 $\pm$ 4,7	19,1 $\pm$ 5,3	8,7 $\pm$ 4,4	9,4 $\pm$ 4,6	53,3 $\pm$ 9,9	89,0 $\pm$ 16,5	62,3 $\pm$ 15,2	41,8 $\pm$ 9,9
8	19,7 $\pm$ 5,3	21,7 $\pm$ 5,6	13,0 $\pm$ 4,8	13,0 $\pm$ 4,8	91,8 $\pm$ 15,8	74,5 $\pm$ 11,7	40,4 $\pm$ 7,4	59,6 $\pm$ 13,7
9	10,6 $\pm$ 3,7	11,5 $\pm$ 4,0	7,3 $\pm$ 3,7	6,7 $\pm$ 3,5	77,7 $\pm$ 14,4	34,3 $\pm$ 5,4	32,3 $\pm$ 5,5	36,2 $\pm$ 6,1

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: % – Porcentagem; GMFI – Média geométrica da intensidade de fluorescência; G – Grupo de bactérias; N. Ops. – Não opsonizados; Ops. – Opsonizados; 1 – *S. chromogenes* AT (Ápice do teto); 2 – *S. chromogenes* IIM T (Infecção intramamária transiente); 3 – *S. chromogenes* IIM P (Infecção intramamária persistente); 4 – *S. haemolyticus* AT (Ápice do teto); 5 – *S. haemolyticus* IIM T (Infecção intramamária transiente); 6 – *S. fleurettii* IIM T (Infecção intramamária transiente); 7 – *S. fleurettii* A (Ambiente); 8 – *S. aureus* SN (Suabe nasal); 9 – *S. aureus* IIM P (Infecção intramamária persistente)

Nos resultados da tabela 7 podemos observar que não houve diferença ($P = 0,33$) entre a porcentagem de neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas ao fagocitarem os isolados bacterianos opsonizados ou não opsonizados. Além disso, não houve diferença na média geométrica da intensidade de fluorescência da fagocitose entre essas duas categorias animal ($P = 0,59$).

A tabela 8 representa a média e o erro padrão da capacidade de resistência à fagocitose de distintos isolados bacterianos opsonizados ou não opsonizados na presença de neutrófilos sanguíneos e a média geométrica da intensidade de fluorescência da fagocitose.

Tabela 8 - Média e erro padrão de neutrófilos sanguíneos que fagocitaram distintos isolados de estafilococos opsonizados e não opsonizados, em porcentagem, e a média geométrica da intensidade de fluorescência da fagocitose – São Paulo – 2017

Fagocitose						
G	%			GMFI		
	N. Ops.	Ops.	Total	N. Ops.	Ops.	Total
1	4,0±2,6	5,1±2,8	4,6±2,7 ^c	23,5±4,4 ^A	21,0±4,2 ^B	22,2±4,3 ^c
2	7,4±3,4	9,9±4,1	8,6±3,8	30,5±5,4 ^B	61,1±14,7 ^A	45,8±12,4
3	7,8±3,5	10,3±4,1	9,1±3,8	30,0±4,7 ^B	31,5±5,0 ^A	30,8±4,9
4	17,0±5,0	18,4±5,0	17,7±5,0 ^a	84,2±11,8 ^B	95,1±14,2 ^A	89,7±13,2 ^a
5	21,1±5,3	21,6±5,2	21,3±5,2 ^a	78,7±10,5 ^B	86,1±11,3 ^A	82,4±10,9 ^a
6	14,3±4,5	18,5±5,0	16,4±4,7 ^a	88,9±13,0 ^A	86,8±12,0 ^B	87,9±12,5 ^a
7	12,3±4,6	14,3±5,0	13,3±4,8	57,8±13,3 ^B	65,4±14,3 ^A	61,6±13,8
8	16,3±5,1	17,4±5,3	16,9±5,2 ^a	65,7±13,4 ^B	67,0±12,8 ^A	66,4±13,1
9	8,9±3,7	9,1±3,8	9,0±3,7 ^b	55,0±12,2 ^A	35,2±5,7 ^B	45,1±10,4 ^b

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: % – Porcentagem; GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência; G – Grupo de bactérias; N. Ops. – Não opsonizados; Ops. – Opsonizados; 1 – *S. chromogenes* AT (Ápice do teto); 2 – *S. chromogenes* IIM T (Infecção intramamária transiente); 3 – *S. chromogenes* IIM P (Infecção intramamária persistente); 4 – *S. haemolyticus* AT (Ápice do teto); 5 – *S. haemolyticus* IIM T (Infecção intramamária transiente); 6 – *S. fleurettii* IIM T (Infecção intramamária transiente); 7 – *S. fleurettii* A (Ambiente); 8 – *S. aureus* SN (Suabe nasal); 9 – *S. aureus* IIM P (Infecção intramamária persistente)

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados não opsonizados e opsonizados

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados bacterianos

*O grupo *S. aureus* IIM P foi considerado padrão (controle)

Na análise da tabela 8, podemos perceber diferença entre os grupos de bactérias, independente da opsonização, em relação à porcentagem da fagocitose pelos neutrófilos. *S. fleurettii* isolados de infecção intramamária transiente ($P < 0,01$), *S. haemolyticus* isolados do ápice do teto ($P = 0,02$), *S. aureus* isolados de suabe nasal ($P = 0,03$) e *S. fleurettii* isolados de infecção intramamária transiente ($P < 0,01$) foram menos resistentes à fagocitose quando comparados ao padrão (*S. aureus* isolados de infecção intramamária persistente). Além disso, a porcentagem de neutrófilos que fagocitaram *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0,01$)

foi menor quando comparada ao mesmo padrão. O gráfico 4 ilustra essas diferenças. Houve diferença ($P < 0.01$) na GMFI da fagocitose pelos neutrófilos entre isolados opsonizados e não opsonizados (Gráfico 5). As bactérias opsonizadas foram mais fagocitadas do que as não opsonizadas. Diferença observada também entre os grupos de bactérias. A GMFI foi maior na fagocitose de *S. haemolyticus* isolados do ápice teto ($P < 0.01$), *S. fleurettii* isolados de infecção intramamária transiente ($P < 0.01$) e *S. haemolyticus* isolados de infecção intramamária transiente ($P < 0.01$) quando comparados ao padrão. Já a GMFI de *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0.01$) foi menor. O gráfico 6 ilustra essas diferenças.

Gráfico 4 – Média e erro padrão da porcentagem de neutrófilos sanguíneos que fagocitaram disintos estafilococos opsonizados e não opsonizados – São Paulo - 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: % – Porcentagem; 1 – *S. chromogenes* AT (Ápice do teto); 2 – *S. chromogenes* IIM T (Infecção intramamária transiente); 3 – *S. chromogenes* IIM P (Infecção intramamária persistente); 4 – *S. haemolyticus* AT (Ápice do teto); 5 – *S. haemolyticus* IIM T (Infecção intramamária transiente); 6 – *S. fleurettii* IIM T (Infecção intramamária transiente); 7 – *S. fleurettii* A (Ambiente); 8 – *S. aureus* SN (Suabe nasal); 9 – *S. aureus* IIM P (Infecção intramamária persistente)

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados bacterianos

*O grupo *S. aureus* IIM P foi considerado padrão (controle)

Barras representam o erro padrão da média

Gráfico 5 – Média e erro padrão da intensidade de fluorescência da fagocitose de estafilococos, opsonizados e não opsonizados, por neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas – São Paulo - 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados não opsonizados e opsonizados

Barras representam o erro padrão da média

Gráfico 6 - Média e erro padrão da intensidade de fluorescência da fagocitose de distintas cepas de estafilococos, opsonizadas e não opsonizadas, por neutrófilos sanguíneos de vacas primíparas e multíparas em terço médio de lactação – São Paulo – 2017

Fonte: (SOUZA, R.M., 2017).

Legenda: GMFI – Média geométrica de intensidade de fluorescência; 1 – *S. chromogenes* AT (Ápice do teto); 2 – *S. chromogenes* IIM T (Infecção intramamária transiente); 3 – *S. chromogenes* IIM P (Infecção intramamária persistente); 4 – *S. haemolyticus* AT (Ápice do teto); 5 – *S. haemolyticus* IIM T (Infecção intramamária transiente); 6 – *S. fleurettii* IIM T (Infecção intramamária transiente); 7 – *S. fleurettii* A (Ambiente); 8 – *S. aureus* SN (Suabe nasal); 9 – *S. aureus* IIM P (Infecção intramamária persistente)

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os isolados bacterianos

*O grupo *S. aureus* IIM P foi considerado padrão (controle)

Barras representam o erro padrão da média

5 DISCUSSÃO

Afinal, quais critérios definem a mastite em vacas primíparas? Alguns autores (ANDERSEN et al., 2010; SAMPIMON et al., 2010; DE VLIEGHER et al., 2012) consideraram não existir consenso, porém, muitas vezes, o estado da glândula mamária é baseado na CCS e na presença ou ausência do microrganismo (SUPRÉ et al., 2011). Diante disso, vários estudos conduzidos opuseram-se ao paradigma de que a glândula mamária seria primariamente estéril (MARTIN et al., 2007; OIKONOMOU et al., 2012) e consideraram a mastite como manifestação de disbiose, ou seja, um desequilíbrio da microbiota mamária (FALETIN et al., 2016). Portanto, o conceito da maioria dos produtores de que as novilhas são totalmente livres de infecção foi subjugado e autores relataram altos índices da doença nesta categoria animal durante o pré e pós-parto (COSTA et al., 1996; COMPTON et al., 2007a; FOX et al., 2009). Porém, não se sabe ao certo como as novilhas são infectadas, pois as fontes de contaminação podem estar relacionadas às bactérias da microbiota da pele (SUPRÉ et al., 2011; TOMAZI et al., 2015) ou presentes na cavidade oral de bezerras durante a mamada cruzada (DE VLIEGHER et al., 2012), ou por meio de microrganismos presentes no ambiente (esterco e camas) que podem ser veiculados por moscas (OWENS et al., 1998; ROBERSON et al., 1998).

Além disso, qual é a importância do diagnóstico precoce em nível de rebanho? Apesar da variação na prevalência e incidência da doença nos diferentes sistemas de produção (SAMPIMON et al., 2010; DE VISSCHER et al., 2014), a ocorrência da doença em vacas primíparas, representa um risco para o rebanho, afeta a produção e saúde do úbere, principalmente, na primeira lactação (COFFEY et al., 1986; TUCKER et al., 1987; MEHRZAD et al., 2009; DE VLIEGHER et al., 2005b). A patogenia permanece, em grande parte, desconhecida e a ausência do diagnóstico precoce pode acarretar em menor produção de leite e aumento da taxa de descarte (DE VLIEGHER et al., 2012).

Tem que se admitir que perguntas como essas motivaram a realização deste estudo e apesar delas serem respondidas por meio da literatura encontrada, coube a nós realizar uma pesquisa que desafiasse a vaca primípara frente a um grupo de patógenos causadores de mastite, para concluir se a predominância da doença ocorre por maior susceptibilidade das mesmas, ou por fatores inerentes aos patógenos.

Diante disso, 62 vacas em lactação foram submetidas à triagem, de acordo com os critérios de inclusão, e doze foram selecionadas (seis primíparas e seis multíparas) para avaliação funcional e comparativa entre os neutrófilos sanguíneos, uma vez que, existe divergência na interação hospedeiro-patógeno manifestada entre primíparas (BURVENICH et al., 2003; VANGROENWEGHE et al., 2004; MEHRZAD et al., 2009) e multíparas (VAN WERNEN et al., 1997; BURVENICH et al., 20003; MEHRZAD et al., 2009).

Embora a capacidade de resistência à fagocitose de isolados bacterianos causadores de mastite tenha sido investigada em macrófagos murinos (AVALL-JÄÄSKELÄINEN et al., 2013), o desafio foi realizado com neutrófilos sanguíneos, que diante de processo infeccioso migram rapidamente para o foco inflamatório, fagocitam e inativam os patógenos (SORDILLO et al., 1997; PAAPE et al., 2002; PAAPE et al., 2003; SOUZA et al., 2012). Alguns autores têm predileção em trabalhar com neutrófilos do leite para avaliação da resposta local da glândula mamária (MEHRZAD et al., 2009; PICCART et al., 2016), mas ela é inferior em eficácia em relação à resposta observada no sangue (MEHRZAD et al., 2009). Vários fatores parecem contribuir para isto, mas o mais aceito é que no leite as células esgotam sua capacidade fagocítica ao englobarem micelas de caseína e glóbulos de gordura (PAAPE et al., 2002; RAINARD & RIOLLET, 2003).

Seguindo o que é proposto na literatura quanto à identificação dos neutrófilos sanguíneos (RAIDAL et al., 1998; BATISTA et al., 2015), foi testada a viabilidade (apoptose, necrose, apoptose e/ou necrose e células viáveis) dos mesmos (VERMES et al., 2000) e não houve diferença entre as médias de vacas primíparas e multíparas, mesmo resultado encontrado por Mehrzad et al. (2009).

A partir daí, com o protagonista e o seu “poder de fogo” pré-estabelecidos, cabe agora discutir a importância do fator patógeno neste estudo. Diante de trabalhos que têm considerado os SNA como microrganismos emergentes e importantes causadores de infecções intramamárias (PITKÄLÄ et al., 2004; BRADLEY et al., 2007; PIEPERS et al., 2009a) em primíparas (FOX, 2009; SAMPIMON et al., 2009; DE VLIEGHER et al., 2012; DE VISSCHER et al., 2015) nos mais diferentes sistemas de produção, sua variação substancial epidemiológica (SUPRÉ et al., 2011; FRY et al., 2014) e seus diferentes perfis de infecção, incitaram ainda mais o desenvolvimento desta pesquisa.

Com a possibilidade de trabalhar com isolados viáveis de SNA, elaborou-se um repertório condizente com o que é encontrado na literatura em relação as principais espécies e suas diferentes origens: *S. chromogenes* encontrados no ápice do teto (DE VLIEGHER et al., 2003; DE VISSCHER et al., 2016) e em infecções intramamárias (SAMPIMON et al., 2009; PARK et al., 2011); *S. fleurettii*, comumente encontrados no ambiente, como ar, areia, maravalha e chão ripado (PIESSENS et al., 2011); *S. haemolyticus* isolados tanto do ambiente, como de quartos infectados (PIESSENS et al., 2011). Ademais, isolados de *S. aureus* de suabe nasal e infecção intramamária persistente também foram selecionados, uma vez que, a fagocitose e morte bacteriana por neutrófilos (SUTRÁ et al., 1990; AARESTRUP et al., 1994) e macrófagos (MULLAN et al., 1985; ZHEN et al., 2008) já foram amplamente estudadas.

Inicialmente, uma dificuldade encontrada foi a padronização da técnica da curva de crescimento dos 50 isolados para identificação da fase exponencial tardia (fase log). Neste momento, as bactérias iniciam seu processo de divisão e a reprodução celular encontra-se ativa, assim como, a atividade metabólica (ZWIETERING et al., 1990). Do mesmo modo que Batista (2015), durante esta fase preparou-se o inóculo para execução dos ensaios imunológicos. Diante de tais resultados, optou-se por utilizar o período de incubação de 18 e 12 horas para os SNA e *S. aureus*, respectivamente. Além disso, outro aspecto de destaque é o fato do estudo ter sido realizado com isolados viáveis, permitindo a quantificação da absorção fagocítica de organismos que são fisiologicamente relevantes para a infecção da glândula mamária. A conjugação com CFSE foi realizada de acordo com Vander Top (2006) que afirmam maior eficácia do protocolo para bactérias gram positivas do que negativas. As últimas são menos permeáveis à molécula do CFSE e são capazes de “bombeá-lo” para fora do citoplasma.

Com o inóculo preparado e devidamente marcado realizou-se o desafio propriamente dito para mensuração da capacidade dos fagócitos em gerar a explosão respiratória *in vitro*, avaliação da habilidade do hospedeiro em deflagar uma resposta imunológica efetiva, habilidade do patógeno em evadir desta resposta, das variações entre indivíduos, da resposta leucocitária frente diversos estímulos ou detectar deficiências funcionais. Tal avaliação pôde ser feita pela quantificação da atividade fagocítica, tanto à porcentagem de células realizando fagocitose, quanto à quantidade de bactérias internalizadas.

Por meio da avaliação *in vitro* da função dos neutrófilos não foram observadas diferenças no *burst* basal entre vacas primíparas e múltíparas. Além disso, não houve diferença da capacidade microbicida dos PMNL e da intensidade de fluorescência obtida após a oxidação, pelo peróxido de hidrogênio intracelular, do DCFH entre esses dois grupos. Contradizendo o resultado encontrado por Mehrzad et al. (2009), em que os neutrófilos de primíparas, mesmo quando não estimulados, apresentaram maior produção de ERO. De acordo com esses autores, a produção ineficiente de ERO por neutrófilos de múltíparas é resultado da disfunção no metabolismo enzimático (proteína quinase C, NADPH-oxidase e mieloperoxidase). O fato desses autores terem selecionados vacas entre quarta e quinta lactações justifica ainda mais a diferença encontrada, enquanto que no estudo em questão as vacas estavam entre a segunda e a terceira lactação, ou seja, o número de partos interfere na produção de ERO pelos neutrófilos (GILBERT et al., 1993; VAN WERVEN et al., 1997; MEHRZAD et al., 2009).

A produção de ERO por PMNL foi avaliada também, após a utilização de estímulos, mas não foram observadas respostas diferentes em relação ao basal. Llamas Moya et al. (2008) mostraram diferenças na funcionalidade entre as células do sistema imunológico de vacas leiteiras primíparas e múltíparas, em particular em termos de atividade do *burst* oxidativo. Várias publicações têm relatado comprometimento da função imunológica de vacas múltíparas quando comparadas com primíparas (GILBERT et al., 1993; MEHRZAD et al., 2005; MEHRZAD et al., 2009; LIMA, 2013). De acordo com Mehrzad et al. (2001), a porcentagem de PMNL e monócitos de vacas primíparas apresentaram maior atividade oxidativa com estímulo de *Escherichia coli*, em comparação com os de múltíparas. Além disso, o *burst* oxidativo também foi maior em primíparas. Mehrzad et al. (2009) e Lima (2013) ao estimularem PMNL com partículas de *S. aureus* observaram maior produção de ERO pelos PMNL de vacas primíparas do que múltíparas.

Não houve diferença ao compararmos neutrófilos de primíparas e múltíparas em relação à fagocitose e morte bacteriana dos isolados de estafilococos. Mehrzad et al. (2009), durante a avaliação da fagocitose de *S. aureus* por neutrófilos de vacas primíparas e múltíparas no início da lactação, observaram uma pronunciada redução da atividade fagocítica tanto das células do sangue quanto do leite de vacas múltíparas. Isto pode explicar a maior incidência de doenças infecciosas em vacas múltíparas, em particular durante o periparto. Na literatura, autores

(HOEBEN et al., 2000; BURVENICH et al., 2003; MEHRZAD et al., 2005) descrevem alta incidência de casos de mastite no período de transição devido à diminuição da função de neutrófilos do sangue e leite, ou seja, o fator número de partos tem efeito sobre essa função (VAN WERVEN et al., 1997; MEHRZAD et al., 2009; LIMA et al., 2013) Vacas múltiparas têm maior produção de leite e balanço energético negativo mais intenso em comparação com as primíparas (MEHRZAD et al., 2005; COFFEY et al., 2006). Assim, é provável que as primíparas são submetidas a menor desafio metabólico durante o parto e o fato das vacas do presente estudo estarem em terço médio de lactação esclarece a não diferença encontrada entre elas.

As vacas do presente estudo estavam sadias durante o momento da coleta de leite e sangue, e por isso, a produção intracelular de ERO basal foi observada, porém com menor intensidade do que quando estimulada por *S. aureus* de infecção intramamária persistente. Quando geradas no metabolismo basal, as ERO não representam ameaça ao organismo, desde que um sistema protetor (sistema antioxidante) seja capaz de se opor à geração dos mesmos. Por outro lado, quando presentes em grandes concentrações, podem induzir alterações severas em moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular (KOBAYASHI et al., 2003; FERREIRA et al., 2007).

Em relação aos grupos de estafilococos algumas diferenças foram encontradas quanto ao estímulo provocado. *S. chromogenes*, mais comumente patógeno isolado de amostras de leite (DE VLIEGHER et al., 2003; SAMPIMON et al., 2009; DE VISSCHER et al., 2016), foi o único a estimular a alta produção de ERO, independente da origem, quando comparado ao *S. aureus* de infecção intramamária persistente. Além disso, a intensidade de fluorescência também foi maior com o estímulo dos isolados deste mesmo grupo. Tais afirmações corroboram com o que é encontrado na literatura quanto à ação protetiva exercida pelas ERO na presença de um agente estranho (WINTERBOURN & ASSMAN, 1990; PAAPE et al., 2002; FERREIRA, 2007).

A capacidade de resistência à fagocitose e atividade bactericida foi avaliada por meio da comparação entre isolados opsonizados e não opsonizados. Em consonância com outros estudos (BARRIO et al., 2000) as condições de opsonização descritas no nosso ensaio *in vitro* revelou que a capacidade de resistência à fagocitose dos isolados opsonizados foi menor do que a dos isolados

não opsonizados, independente da categoria animal (primíparas x multíparas). Tal resultado está de acordo com o que é descrito na literatura de que a fagocitose é facilitada pelas opsoninas, das quais IgG e complemento (C3) se destacam (GREWAL et al., 1978; HOWARD et al., 1980; MEHRZAD et al., 2009).

Ao comparar a capacidade de resistência à fagocitose e morte bacteriana entre os grupos de estafilococs, algumas diferenças significantes foram observadas. De maneira geral, a atividade fagocítica dos neutrófilos frente a estes isolados de origens distintas não foi excessiva, que corrobora com alguns autores, que afirmam que eles são patógenos secundários, oportunistas da microbiota da pele (TAPONEN, 2008; SUPRÉ et al., 2011; TOMAZI et al., 2015) e não são reconhecidos pelo sistema imune do animal como agente invasor. Além do mais é compreensível, que pelo fato dos isolados estarem vivos, seus fatores de virulência, como a aderência e internalização celular (ZHANG & MADDOX, 2000; ALMEIDA & OLIVER, 2001; ANAYA-LÓPEZ et al., 2006; HYVÖNEN et al., 2007), estariam ativos, facilitando a evasão à atividade neutrofílica. Mesmo que esses fatores sejam equivalentes aos produzidos pelo *S. aureus*, a capacidade do último ainda é mais efetiva (ZHANG & MADDOX, 2000). Mais uma explicação para essa diferença é o habitat de origem destes isolados (DE VISSCHER et al., 2014). *S. fleurettii* e *S. haemolyticus* apresentaram menor resistência à fagocitose por serem considerados patógenos ambientais que são reconhecidos como agente agressor e facilmente eliminados da glândula mamária (PICCART et al., 2016), assim como, *S. aureus* isolado de suabe nasal. Em relação ao *S. chromogenes*, a capacidade natural de adaptação ao hospedeiro (DE VISSCHER et al., 2014; FRY et al., 2014), de frequentemente ser isolado de amostras de leite de vacas primíparas e de causar infecções intramamárias (SAMPIMON et al., 2009; PARK et al., 2011), quer seja por ser considerado patógeno oportunista (microbiota) (TAPONEN et al., 2008) ou pelos seus fatores de virulência (ZHANG & MADDOX, 2000; ALMEIDA & OLIVER, 2001; ANAYA-LÓPEZ et al., 2006; HYVÖNEN et al., 2007) fez com que apresentasse maior resistência à fagocitose.

6 CONCLUSÃO

- Por mais evidente que sejam as variações encontradas na literatura, as semelhanças entre a atividade funcional de neutrófilos sanguíneos de primíparas e múltiparas, encontradas neste estudo, deve-se à interferência do número de partos, assim como, da fase de lactação.

- As diferenças entre os SNA repetiram as descrições da literatura de que a variação substancial epidemiológica entre este grupo resulta no surgimento de diferentes perfis de infecção intramamária, quanto mais adaptado à mama, maior resistência à fagocitose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; SCOTT, N.L.; SORDILLO, L.M. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. **Infection and Immunity**, v.62, p.5679-5682, 1994.
- ALMEIDA, R.A.; OLIVER, S.P. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v.31, n.5, p.205-212, 2001.
- ANAYA-LÓPEZ, J.L.; CONTREAS-GUZMÁN, O.E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research Veterinary of Science**, v.81, p.358-361, 2006.
- 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.
- ANDREW, S.M.; MOYES, K.M.; BORM, A.A.; FOX, L.K.; LESLIE, K.E.; HOGAN, J.S.; OLIVER, S.P.; SCHUKKEN, Y.H.; OWENS, W.E.; NORMAN, C. Factors associated with risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.150-156, 2009.
- AVALL-JÄÄSKELÄINEN, S.; KOORT, J.; SIMOJOKI, H.; TAPONEN, S. Bovine-associated CNS species resist phagocytosis differently. **BMC Veterinary Research**, 9:227, 2013.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cells counts. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.411-419, 1998b.

BARRIO, B.; VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Veterinary Research**, v.31, p.603-609, 2000.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M.C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v.130, n.4, p.1910-1917, 1983.

BATISTA, C.F. **Dinâmica de fagócitos sanguíneos e alveolares em bezerros com mannheimiose**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

BIRGEL, E.H.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M.K.; VASCONCELLOS, S.A.; LARSSON, C.E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F.J. **Patologia clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p.177-213.

BRADLEY, A.J.; LEACH, K.A.; BREEN, J.E.; GREEN, L.E.; GREEN, M.J. Survey of the incidence and aetiology mastitis on dairy farms in England and Wales. **Veterinary Record**, v.160, n.8, p.253-257, 2007.

BRYAN, M.; TAYLOR, K. Periparturient use of parenteral micronised procaine penicillin to reduce risk of clinical mastitis in heifers after calving. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.143-149, 2009.

BUROW, S.; VALET, G. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCFH). **European Journal of Cell Biology**, v.43, p.128-133, 1987.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity *E. coli* mastitis in mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v.34, p.521-562, 2003.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B.N. Detection of picomoles levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, v.134, n.1, p.111-116, 1983.

COFFEY, E.M.; VINSON, E.; PERSON, R.E. Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.552-555, 1986.

COFFEY, M.P.; HICKEY, J.; BROTHERSTONE, S. Genetic aspects of growth of Holstein-Friesian dairy cows from birth to maturity. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.322-329, 2006.

COMPTON, C.W.R.; HEUER, C.; PARKER, K.I.; McDOUGALL, S. Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4157-4170, 2007a.

COSTA, E.; MELVILLE, P.; RIBEIRO, A.; WATANABE, E.; VIANI, F.; WHITE, C. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, v.29, p.151-155, 1996.

DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOCKS, R.N.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; PIEPERS, S.; DE VLEGHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.172, p.466-474, 2014.

DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; DE VLEGHER, S. *Short communication*: Species group specific predictors at cow and quarter level for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in dairy cattle throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1-6, 2015.

DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; SUPRÉ, K., HAESEBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Teat apex colonization with coagulase-negative *Staphylococcus* species before parturition: distribution and species-specific risk factors. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1427-1439, 2016.

DE VLIEGHER, S.; LAESENS, H.; DEVRIESE, L.A.; OPSOMER, G.; LEROY, J.L.M.; BARKEMA, H.W.; DE KRUIF, A. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. **Veterinary Microbiology**, v.92, n.3, p.245-252, 2003.

DE VLIEGHER, S.; BARKEMA, H.W.; STRYHN, H.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.938-947, 2005b.

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

FALETIN, H. et al. Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. **Frontiers in Microbiology**, 7:480, 2016.

FERREIRA, F. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.7, n.2, p.257-275, 2007.

FOX, L.K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.82-88, 2009.

FRY, P.R.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarters milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.4876-4885, 2014.

GILBERT, R.O.; GRÖHN, T.; MILLER, P.M.; HOFFMAND, D.J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.36, p.75-82, 1993.

GREWAL, A.S.; ROUSE, B.T.; BABIUK, L.A. Characterization of surface receptors on bovine leukocytes. International **Archives Allergy and Applied Immunology**, v.56, p.289-300, 1978.

GROMMERS, F.J.; VAN DE GEER, D.; VAN DER VLIET, H.; HENRICKS, P.A.; NIJKAMP, F.P. Polymorphonuclear leucocyte function: relationship between induced migration into the bovine mammary gland in vitro cell activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.23, p.75-83, 1989.

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

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v.117, n.1, p.53-58, 1989.

HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C.; VERCAUTEREN, R. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis cows. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.985-994, 1990.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v.82, n.2, p.253-259, 1985.

HOEBEN, D.; MONFARDINI, E.; OPSOMER, G.; DOSOGNE, H.; DE KRUIF, A.; BERCKERS, J.F.; BURVENICH, C. Chemiluminescence fo bovine polymorphonuclear leukocytes during the periparturient period and relation with metabolic parameters and bovine pregnancy-associated glycoprotein. **Journal of Dairy Research**, v.67, p.249-259, 2000.

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

HOWARD, C.J.; TAYLOR, G.; BROWNLIE, J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. **Research Veterinary Science**, v.29, p. 128-130, 1980.

HYVÖNEN, P.; KÄYHKÖ, S.; TAPONEN, S., VON WRIGHT, A.; PYÖRÄLÄ, S. Internalization by mammary epithelial cells of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **In: Proceedings of the Heifer Mastitis Conference** 2007, Ghent, Belgium, pp.42-43.

KEHRER, J.P.; PARAIDATHATHU, T. The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. **Free Radical Research Communications**, v.16, n.4, p.217-225, 1992.

KIRK, J.H.; WRIGHT, J.C.; BERRY, S.L.; REYNOLDS, J.P.; MASS, J.P.; AHMADI, A. Relationship of milk culture status at calving with somatic cell counts and milk production of dairy heifers during early lactation on Californian dairy. **Preventive Veterinary Medicine**, v.28, n.3, p.187-198, 1996.

KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. **Biochemical Society Transactions**, v.32, p.474-476, 2003.

KOBZIK, L.; GODLESKI, J.J.; BRAIN, J.D. Selective down regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis. **Journal Immunology**, v.144, p.4312-4319, 1990.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; YUTAKA, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v.70, n.13, p.2446-2453, 1998.

KREIGER, M.; FRITON, G.; HOFER, J.; FUCHS, K.; WINTER, P. Effects of periparturient systemic treatment with penethamate hydriodide on udder health and milk yield of dairy heifers. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.392-398, 2007.

LAFFRANCHI, A. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.

LIMA, A.S. **Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltiparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE**. 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013.

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2011. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3466-3472, 2003.

MARTIN, R.; HEILIG, H.G.; ZOETENDAL, E.G.; JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; SMIDT, H.; RODRIGUEZ, J.M. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research Microbiology**, v.158, p.31-37, 2007.

MEHRZAD, J.; DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. A comparative study of bovine blood and milk neutrophil functions with luminol-dependent chemiluminescence. **Luminescence**, v.16, n.6, p.343-356, 2001.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. **Veterinary Research**, v.36, p.101-116, 2005.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.106-112, 2009.

MULLAN, N.A.; CARTER, E.A.; NGUYEN, K.A. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. **Research Veterinary Science**, v.38, p.160-166, 1985.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v.82, n.5, p.521-533, 2002.

NETO, J.M.F.; DONADON, C.C. Cinética de marcadores de estresse oxidativo para avaliação de “overreaching” induzido pelo exercício físico exaustivo. Revista Digital, Buenos Aires, v.12, n.162, 2011. Disponível em:
<<http://www.efdeportes.com/efd162/avaliacao-de-overreaching-induzido-pelo-exercicio.htm>> Acesso em 18 nov. 2017.

NYMAN, A.K.; EKMAN, T.; EMANUELSON, U.; GUSTAFSSON, A.H.; HOLTENIUS, K.; WALLER, K.P.; SANDGREN, C.H. Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, p.142-160, 2007.

OIKONOMOU, G.; MACHADO, V.S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. **Plos One**, 7:e47671, 2012.

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.1366-1377, 2008.

O’RIORDAN, K.; LEE, J.C. Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p.218-234, 2004.

OWENS, W.E.; OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; RAY, C.H.; NICKERSON, S.C. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1122-1124, 1998.

PAAPE, M.J.; 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, n.2, p.109-121, 2002.

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

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; McGUIRE, M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHO, W.M.; BOHACH, G.A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v.147, -.142-148, 2011.

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 na injectable antibiotic, or both, precalving. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.169-181, 2008.

PICCART, K.; VERBEKE, J.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; HAESBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Local hesponse following an intramammary challenge with *Staphylococcus fleuretti* and diferent strains of *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. **Veterinary Research**, 47:56, 2016.

PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H.W. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.113-120, 2009a.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRÉ, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRICKX, M.; DE VLIEGHER, S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus species* from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2933-2934, 2011.

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(8), p.2433-2441, 2004.

POLITIS, A.D.; SIVO, J.; DRIGGERS, P.H.; OZATO, K.; VOGEL, S.N. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors. **The Journal of Immunology**, v.148, n.3, 801-807, 1992.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.3-8, 2009.

RAIDAL, S.I.; BAILEY, G.D.; LOVE, D.N. The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. **The Veterinary Journal**, v.156, n.2, p.107-116, 1998.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. **Reproduction Nutrition Development**, v.43, n.5, p.439-457, 2003.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.687-693, 1998.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos components do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-335, 1947.

SALLUSTO F.; MACKAY, C.R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v.16, n.6, p.724-731.

SAMPIMON, O.C.; BARKEMA, H.W.; BERENDS, I.M.; SOL, J.; LAM, T.J. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-

negative staphylococci in Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.37-44, 2009.

SAMPIMON, O.C.; VAN DEN BORNE, B.H.; SANTMAN-BERENDS, I.; BARKEMA, H.W.; LAM, T.J.G.M. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.318-324, 2010.

SCHALM, O.W. *Streptococcus agalactiae* in the udder of heifers at parturition traced to sucking among calves. **Cornell Veterinary**, v.32, p.32-39, 1942.

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 threshold for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1833-1840, 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.; GONZALEZ, R.N.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; SCHULT, H.F.; SANTISTEBA, C.G.; WELCOME, F.L.; BENNETT, G.J.; ZURAKOWSKI, M.J.; ZADOKS, R.N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v.134, p. 09-14, 2009.

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

SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p.135-146, 2002.

SOUZA, F.N.; RAMOS SANCHEZ, E.M.; HEINEMANN, M.B.; GIDLUND, M.A.; REIS, L.C.; BLAGITZ, M.G.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; CERQUEIRA, M.M.O.P.

The innate immunity in bovine mastitis: the role of pattern-recognition receptors. **American Journal of Immunology**, v.8, p.166-178, 2012.

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

SUTRA, L.; RAINARD, P.; POUTREL, B.; BUSQUE, P.; HIGGINS, R.; SÉNÉCHAL, S.; MARCHAND, R. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.2253-2258, 1990.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.7, p.3301-3307, 2007.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research**, v.75, p.422-429, 2008.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J.L.; BARREIRO, J.R.; ARCARI, M.A.; DOS SANTOS, M.V. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.3071-3078, 2015.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.639-647, 1990.

TUCKER, H.A. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1958-1966, 1987.

UNDERHILL D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.825-852, 2002.

VAN WERVEN, T.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; DAEMEN, A.J.J.M.; SCHUKKEN, Y.H.; BRAND, A.; BURVENICH, C. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.67-74, 1997.

VANDER TOP, E.A.; PERRY, G.A.; GENTRY-NIELSEN, M.J. A novel flow cytometric assay for measurement of *In Vivo* pulmonar neutrophil phagocytosis. **BMC Microbiology**, 6:61, 2006.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **Veterinary Journal**, v.203, p.44-51, 2014.

VANGROENWEGHE, F.; RAINARD, P.; PAAPE, M.; DUCHTEAU, L; BURVENICH, C. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.4132-4144, 2004.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v.243, n.1-2, p.167-190, 2000.

WINTERBOURN, C.C.; ASSMAN, W.B. Neutrophil oxidants: production and reactions. In: DAS, D.K.; ESSMAN, W.B. (Ed). **Oxygen radicals: systemic events and disease processes**. New York: Karger, 1990. p.31-70.

WEBER, L.; PETERHANS, E.; WYLER, R. The role chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.4, n.3, p.397-412, 1983.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.381-390, 1990.

ZHANG, S.; MADDUX, C.W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. **Infection and Immunity**, v.68, p.1102-1108, 2000.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: cause and control. **Journal of Animal Science**, v.86, n.1, p.57-65, 2008.

ZHEN, Y.H.; JIN, L.J.; GUO, J.; LI, X.Y.; LI, Z.; FANG, R.; XU, Y.P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1529-1535, 2008.

ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1875-1881, 1990.

ANEXO A – PBS diluído

PBS (10 vezes concentrado):

- Na_2HPO_4 anidro (Fosfato Dissódico): 14,2 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato Monossódico): 3,6 gramas
- NaCl (Cloreto de Sódio): 82 gramas
- Água Milliq: 1.000 mL
- Pesar todos os ingredientes
- Colocar os ingredientes dentro de um béquer
- Homogeneizar
- Ajustar no balão
- Ajustar o pH entre 7,2 a 7,4
- Colocar em frascos
- Armazenar na geladeira

PBS diluído:

- Diluir 100 mL do PBS concentrado em 900 mL de água destilada para totalizar 1 L
- Ver o pH no pHômetro: 7,2 a 7,4
- Autoclavar

ANEXO B – Solução tampão de ligação

Tampão de ligação:

Preparo de 1000 mL de solução:

10 mL de hepes (2-hidroxietil)

8,76 gramas de NaCl (Cloreto de Sódio)

0,373 gramas de KCl (Cloreto de Potássio)

0,203 gramas de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de Magnésio hexahidratado)

0,265 gramas de CaCl_2 (Cloreto de Cálcio)

1000 mL de Água MilliQ

- Pesar todos os ingredientes
- Colocar os ingredientes dentro do balão
- Homogeneizar
- Autoclavar
- Colocar em falcons de 50 mL
- Armazenar na geladeira

NaCl (Cloreto de Sódio)= Synth – Ref. C1060.01.AH

KCl (Cloreto de Potássio)= Synth – Ref. C1.065

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de Magnésio hexahidratado)= Synth – Ref. C2014.01.AG

CaCl_2 (Cloreto de Cálcio)= Synth – Ref. 01C2013.01.AH

APÊNDICE A – Lista dos isolados bacterianos

Estafilococos coagulase negativa (ECN)

Nº USP	Nº GENT	ESPÉCIE	ORIGEM
1	ADV 51	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto
2	ADV 115	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto
3	ADV 351	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto
4	ADV 11	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto
5	ADV 590	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto
6	KS 239	<i>S. chromogenes</i>	Transiente
7	KS 278	<i>S. chromogenes</i>	Transiente
8	KS 276	<i>S. chromogenes</i>	Transiente
9	KS 158	<i>S. chromogenes</i>	Transiente
10	KS 9	<i>S. chromogenes</i>	Transiente
11	KS 62	<i>S. chromogenes</i>	Persistente
12	KS 185	<i>S. chromogenes</i>	Persistente
13	KS 304	<i>S. chromogenes</i>	Persistente
14	KS 33	<i>S. chromogenes</i>	Persistente
15	KS 19	<i>S. chromogenes</i>	Persistente
16	ADV 288	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto
17	ADV 307	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto
18	ADV 191	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto
19	ADV 452	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto
20	ADV 41	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto
21	KS 174	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente
22	KS 221	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente
23	KS 260	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente
24	KS 37	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente
25	KS 41	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente
26	KS188	<i>S. fleurettii</i>	Transiente
27	KS267	<i>S. fleurettii</i>	Transiente
28	KS290	<i>S. fleurettii</i>	Transiente
29	KS277	<i>S. fleurettii</i>	Transiente

30	KS275	<i>S. fleurettii</i>	Transiente
31	MB4755	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha
32	MB4761	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado
33	MB5130	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha
34	MB5144	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado
35	MB5155	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado
36	MB5177	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha
37	MB5189	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha
38	MB5221	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha

Staphylococcus aureus

Nº USP	Nº UFMG	ESPÉCIE	ORIGEM
39	290W	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
40	716	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
41	1341	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
42	486	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
43	89	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
44	743	<i>S. aureus</i>	Swab Nasal
45	838	<i>S. aureus</i>	Persistente
46	1241	<i>S. aureus</i>	Persistente
47	3483	<i>S. aureus</i>	Persistente
48	3503	<i>S. aureus</i>	Persistente
49	3520	<i>S. aureus</i>	Persistente
50	3594	<i>S. aureus</i>	Persistente

APÊNDICE B – Bactérias não marcadas

Bactérias não marcadas					
ECN	Espécie	Origem	Diluição	Microlitros (MOI 1:25)	Arredondamento
1	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	-	11,16071429	11,2
2	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	-	5,387931034	5,4
3	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	-	6,5104	6,5
4	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	-	6,720430108	6,7
5	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:1000	4,464285714	4,5
6	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:1000	7,8125	7,8
7	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:10	2,111486486	2,1
8	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:10	8,928571429	8,9
9	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:10	2,376425856	2,4
10	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:1000	2,572016461	2,6
11	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	-	1,116071429	1,1
12	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	1:100	2,893518519	2,9
13	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	-	2,232142857	2,2
14	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	-	6,25	6,3
15	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	-	12,5	12,5
16	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	-	11,16071429	11,2
17	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:1000	2,604166667	2,6
18	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	-	2,34962406	2,3
19	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:100	1,116071429	1,1
20	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:10000	3,765060241	3,7
21	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	30,19323671	30,2
22	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	1:10000	6,067961165	6,1
23	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	62,5	62,5
24	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	1:1000	6,720430108	6,7
25	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	1,893939394	1,9
26	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	-	85,61643836	85,6
27	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:10000	3,048780488	3,0
28	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:10000	1,578282828	1,6
29	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:1000	4,280821918	4,3

30	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:1000	3,765060241	3,8
31	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10000	3,765060241	3,8
32	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	1:10000	4,006410256	4,0
33	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10000	4,595588235	4,6
34	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	1:10000	4,287671233	4,3
35	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	1:10000	2,264492754	2,3
36	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10000	2,264492754	2,3
37	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:1000000	1,188212928	1,2
38	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10000	3,834355828	3,8

Staphylococcus aureus

S. aureus	Espécie	Origem	Diluição	Microlitros (MOI 1:25)	Arredondamento
39	89	Swab nasal	1:10000	1,21124031	1,2
40	290W	Swab nasal	1:1000	2,289377289	2,3
41	486	Swab nasal	1:10000	1,996805112	2,0
42	716	Swab nasal	1:10000	1,876876877	1,9
43	743	Swab nasal	1:10000	1,550868486	1,6
44	838	Persistente	1:1000	1,893939394	1,9
45	1241	Persistente	-	1,5625	1,6
46	1341	Swab nasal	1:1000	3,90625	3,9
47	3483	Persistente	1:1000	5,681818182	5,7
48	3503	Persistente	1:10	5,081300813	5,1
49	3520	Persistente	-	5,208333333	5,2
50	3594	Persistente	-	2,083333333	2,1

APÊNDICE C – Bactérias marcadas

Bactérias marcadas CFSE					
ECN	Espécie	Origem	Diluição	Microlitros (MOI 1:25)	Arredondamento
1	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:10000	3,019323671	3,1
2	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:10000	9,920634921	9,9
3	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:10	1,453488372	1,5
4	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:1000	2,083333333	2,1
5	<i>S. chromogenes</i>	Ápice teto	1:10000	9,920634921	9,9
6	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:1000	9,920634921	9,9
7	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:1000	5,681818182	5,7
8	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	-	6,067961165	6,1
9	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:100	1,893939394	1,9
10	<i>S. chromogenes</i>	Transiente	1:10000	8,561643836	8,6
11	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	1:10	4,807692308	4,8
12	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	1:10	2,083333333	2,1
13	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	1:10000	5,081300813	5,1
14	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	1:1000	1,358695652	1,4
15	<i>S. chromogenes</i>	Persistente	-	40,8496732	40,8
16	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	-	13,58695652	13,6
17	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:10000	4,280821918	4,3
18	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	-	9,920634921	9,9
19	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:100	5,841121495	5,8
20	<i>S. haemolyticus</i>	Ápice teto	1:1000	2,083333333	2,1
21	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	1:1000	2,083333333	2,1
22	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	7,8125	7,8
23	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	11,16071429	11,2
24	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	15,625	15,7
25	<i>S. haemolyticus</i>	Transiente	-	1,5625	1,6
26	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	-	75,30120482	75,3
27	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:10000	2,062706271	2,1
28	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:10000	1,104240283	1,1
29	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	-	41,66666667	41,7

30	<i>S. fleurettii</i>	Transiente	1:1000	1,25	1,3
31	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:1000	1,893939394	1,9
32	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	1:100	6,25	6,3
33	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10	2,717391304	2,7
34	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	1:1000	1,179245283	1,2
35	<i>S. fleurettii</i>	Chão Ripado	-	145,3488372	145,3
36	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	-	4,08496732	4,1
37	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:10000	6,720430108	6,7
38	<i>S. fleurettii</i>	Maravalha	1:1000	1,041666667	1,0

Staphylococcus aureus

<i>S. aureus</i>	Espécie	Origem	Diluição	Microlitros (MOI 1:25)	Arredondamento
39	89	Swab nasal	1:1000	3,125	3,1
40	290W	Swab nasal	-	27,17391304	27,2
41	486	Swab nasal	-	56,81818182	56,8
42	716	Swab nasal	1:1000	3,125	3,1
43	743	Swab nasal	1:1000	6,720430108	6,7
44	838	Persistente	1:10000	3,125	3,1
45	1241	Persistente	1:10	8,223684211	8,2
46	1341	Swab nasal	1:10000	1,917177914	1,9
47	3483	Persistente	1:10000	2,289377289	2,3
48	3503	Persistente	1:10	6,25	6,3
49	3520	Persistente	-	9,46969697	9,5
50	3594	Persistente	1:1000	2,717391304	2,7