UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CLAUDIO DONATO DE OLIVEIRA SANTOS

Estudo da ação de microrganismos probióticos sobre patógenos causadores de mastite em bovinos de leite

Lorena – SP

2015

CLAUDIO DONATO DE OLIVEIRA SANTOS

Estudo da ação de microrganismos probióticos sobre patógenos causadores de mastite em bovinos de leite

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Dezembro, 2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Claudio Donato de Oliveira
Estudo da ação de microrganismos probióticos sobre patógenos causadores de mastite em bovinos de leite / Claudio Donato de Oliveira Santos; orientador Ismael Maciel de Mancilha - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
109 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Probióticos. 2. Mastite. 3. Inibição. 4. Streptococcus agalactiae. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

Dedico esta tese à minha família e à Flavia, com amor, admiração e gratidão por vossa paciência, compreensão e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Todo Poderoso, por todos os momentos de desafio e aprendizado proporcionados por Ele a mim.

Aos bons amigos, que residem nas esferas da Espiritualidade e a todas as Fraternidades do espaço, que silenciosamente contribuem e nos dão forças para seguir pelos caminhos estreitos da vida, com as palavras e energias sublimes nos momentos certos. Adorei as almas! Que assim seja!

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, por todo o ensinamento e amizade sincera, pelos exemplos de disciplina, competência e dedicação, pelas lições, e pela valiosa oportunidade, confiança, orientação e ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho. Que esta amizade se perpetue ao longo da eternidade.

Aos bons amigos Juan Rivaldi, Victor Daniel, Flavio Ferraz, Bruno Guedes, Aline Francisca, Bruna Gonçalves e Isabela Ferreira, pela amizade e apoio verdadeiros nos momentos de dificuldade, pelos bons momentos compartilhados e pela troca produtiva de ideias.

Ao Professor e grande amigo Fabio Antônio Colombo, da Universidade Federal de Alfenas, pela amizade sincera e verdadeira e pela ajuda na realização deste trabalho e ao Prof. Marcos José Marques pelo apoio no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da UNIFAL – MG.

Ao senhor Carlos Alberto Alves Jannuzzelli, pela ceder o espaço e os animais para a execução deste trabalho.

Aos Professores Hélio Langoni e José Carlos de Figueiredo Pantoja, da FMVZ – Unesp, Botucatu, pela oportunidade e ensinamentos tão valiosos e que contribuíram tanto para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da EEL/USP – Messias Borges pela amizade e ajuda nos momentos de maior necessidade; Maria das Graças Felipe, pelo conhecimento transmitido; Arnaldo Marcio, pela presteza e apoio; Maria Bernadete de Medeiros por todo esclarecimento e apoio profissional únicos, João Paulo e Livia pelo companheirismo e oportunidade de estágio de docência. Aos Professores André Ferraz, Adriane Milagres e Inês Roberto por acreditarem no meu esforço.

Aos funcionários da EEL, Sandra Borges, Cida Jacó, Simone Colombo, Bruno Marton, Isnaldi Rodrigues, André Silva e Nadir Magalhães. Aos funcionários da Biblioteca, em especial Regina Horta, Joel, Nelson e Paulo, pela ajuda e compreensão.

Aos técnicos Zé Cobrinha e Paulo Roberto (claaaaro!!). A todos os funcionários da oficina de manutenção da EEL, pela ajuda e amizade. Aos guardas patrimoniais da EEL, pela amizade e companhia.

À Capes, pelas bolsas concedidas ao longo deste trabalho, e à FAPESP, pelo apoio financeiro à presente pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLAUDIO DONATO DE OLIVEIRA SANTOS, filho de Jorge Marcelino dos Santos e Maria da Glória de Oliveira Santos, nasceu em 14 de fevereiro de 1977, em Lorena, São Paulo.

Em março de 1996, iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Federal de Alfenas – MG. Em dezembro de 2001, graduou-se em Farmácia – Bioquímica e Industrial, tendo trabalhado em indústria farmacêutica no RJ e em drogarias até 2008.

Em abril de 2011 obteve o título de Mestre em Ciências pelo PPG em Biotecnologia Industrial da EEL/USP, na área de concentração de Microbiologia Aplicada. Ainda em 2011, reingressou no mesmo Programa de Pós Graduação e mesma área de concentração, agora em nível de doutorado, submetendo-se à defesa da tese em novembro de 2015.

Desde fevereiro de 2013 atua como coordenador do curso de graduação em Farmácia das Faculdades Integradas Teresa D'Ávila – FATEA, em Lorena, onde também atua como docente nas disciplinas de Microbiologia, Imunologia, Biossegurança e Patologia Geral, nos cursos de Farmácia, Enfermagem e Ciências Biológicas.

RESUMO

SANTOS, C. D. O. **Estudo da ação de microrganismos probióticos sobre patógenos causadores de mastite em bovinos de leite.** 2015. 109p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária que constitui uma doença comum no setor pecuário leiteiro, evidenciado principalmente durante o período de lactação de vacas leiteiras e, cujos principais agentes etiológicos são o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. e espécies de coliformes. Os protocolos de combate à mastite preconizam o uso de antibióticos, o que pode trazer riscos à saúde dos animais e humana. Dependendo do agente patogênico, esta estratégia é considerada frequentemente ineficiente e de alto custo, o que leva pesquisadores a buscarem alternativas à antibioticoterapia, testando princípios ativos homeopáticos, fitoterápicos e micro-organismos probióticos, que apresentam potencial como alternativa promissora para a terapia quimioterápica. As formulações contendo bactérias probióticas podem representar uma alternativa de baixo custo para o combate à mastite, com a vantagem de não estimular a resistência entre os patógenos. Desta forma, este estudo baseou-se na avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus* frente a agentes patógenos causadores de mastite, bem como na avaliação *in vivo* da inocuidade de formulações contendo probióticos em vacas em lactação. Para tanto, 6 cepas de *Lactobacillus*, na forma isolada e na forma de *pool* foram avaliadas quanto à capacidade inibitória sobre *Streptococcus agalactiae* (cepas 1 e 2) por diferentes técnicas de difusão em ágar e co-cultura em meio líquido. A inibição pela técnica de co-cultura foi avaliada mediante determinação de células viáveis das cepas patogênicas por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). De acordo com os resultados observados no estudo de inibição *in vitro*, foram preparadas formulações probióticas utilizando dois veículos diferentes, sendo uma emulsão (Formulação A) e outra utilizando um veículo de um medicamento comercial (Formulação B) adicionadas de células de *Lactobacillus* na forma isolada e na forma de *pool*. Estas formulações foram avaliadas quanto à inocuidade em 17 vacas separadas em grupos sob regime de 1 ordenha/dia (A e B1) e 2 ordenhas/dia (B2), mediante a aplicação das formulações A e B contendo 10^9 ou 10^6 células/dose. Ao longo do cada tratamento, foram avaliados parâmetros fisiológicos como temperatura do úbere, presença de hiperemia, inchaço e manifestação de dor, contagem de células somáticas (CCS), *California Mastitis Test* (CMT), bem como condutividade elétrica e aspecto do leite e avaliação microbiológica. O estudo de inibição em co-cultura mostrou que as cepas de *Lactobacillus* avaliadas inibiram o crescimento das cepas patogênicas, em níveis superiores a 75% após 72 horas de ensaio. Após 24 horas, os maiores níveis de inibição sobre *S. agalactiae* cepa 1 foram exercidos pelas cepas *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 9338, com índices de inibição de 99,79% e 99,91%, respectivamente. Nas mesmas condições a inibição de *S. agalactiae* cepa 2 por *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. delbrueckii* UFV H2B20 foi de 86,7% e 79,5%, respectivamente. Estes resultados indicam o potencial de inibição das cepas de *Lactobacillus* estudadas sobre *S. agalactiae* causadora de mastite. Estudos de inocuidade demonstraram que as formulações probióticas (A e B) induziram reação inflamatória no úbere dos animais, confirmado pelo aumento significativo da condutividade elétrica do leite (CEL), CCS ($p < 0,05$), bem como do escore de CMT. As formulações testadas no presente estudo não se mostraram adequadas ao emprego terapêutico na cura da mastite, uma vez que no teste de inocuidade provocaram processos inflamatórios nas glândulas mamárias dos animais testados.

Palavras-chave: Probióticos. Mastite. Inibição. *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

SANTOS, C. D. O. **Assessment of probiotics activity on pathogenic agents of mastitis in dairy bovine.** 2015. 109p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Bovine mastitis is a common disease in dairy farms, usually observed during lactation period in dairy cattle, whose main etiological agents are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. and coliform species. Current protocols of mastitis therapy include the use of antibiotics, which may represent serious risks for both animal and human health. Depending on the pathogen specie, this strategy is often considered ineffective and highly expensive, what stimulates scientists to search for alternative treatments, including homeopathic or phytotherapic drugs or probiotic microorganisms, which may be a good alternative to chemotherapeutic drugs. Formulations containing probiotic bacteria may represent a low-cost alternative for mastitis treatment. The present study aimed to assess *in vitro* ability of *Lactobacillus* strains to inhibit mastitis pathogens growth, as well as *in vivo* assessment of the safety of formulations containing probiotics in cows with predisposition or affected by mastitis. Thus, six *Lactobacillus* strains were evaluated on their inhibitory ability over *Streptococcus agalactiae* (strains 1 and 2) by techniques of agar diffusion and co-culture in liquid medium. The effectiveness of the co-culture was evaluated by enumerating viable pathogen cells through quantitative polymerase chain reaction (qPCR). According to the results of *in vitro* study, two formulations were prepared based on a probiotic emulsion (formula A) and a commercial matrix (formula B) containing *Lactobacillus* cells (isolated or pool). Safety tests for the formulations were performed in 17 cows, which were separated into two groups under 1 milking/day (A and B1) and another group submitted to 2 milkings/day (B2), through the application of preparation A or preparation B containing 10^9 or 10^6 cells/dose. In each treatment, every cow was assessed on physiological parameters including temperature, presence of hyperemia, swelling and pain, somatic cell count (SCC), electrical conductivity and aspect of milk (color and clots/lumps formation) and microbiological evaluation. The results of the inhibition studies in co-culture showed that all *Lactobacillus* strains inhibited the growth of pathogenic strains, in at least 75% after 72 h of test. The highest levels of inhibition of *S. agalactiae* strain 1 were performed by strains *L. acidophilus* ATCC 4356 and *L. fermentum* ATCC 9338, at level of 99.79% and 96.70% after 24h, respectively. For the same period, the inhibition of *S. agalactiae* strain 2 by *L. acidophilus* ATCC 4356 and *L delbrueckii* UFV H2B20 was 86.7 % and 79.5%, respectively. These results showed the potential of *Lactobacillus* strains studied concerning to the inhibition of mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*. Safety studies showed that both formulations evaluated induced inflammatory response in the udder of the animals, what was confirmed by significant raise on electric conductivity and SCC ($p < 0,05$) and CMT scores on milk. All formulations were considered inappropriate to be used in mastitis therapeutics, once they failed at safety tests, inducing mastitis on tested animals.

Keywords: Probiotics. Mastitis. Inhibition. *Streptococcus agalactiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto do resíduo observado no leite resultante dos tetos tratados com a formulação A7 71
Figura 2. Ocorrência de resíduos na peneira do filtro de leite (Formulação A7) ... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da emulsão base para o desenvolvimento da Formulação A 45
Tabela 2. Planejamento experimental para avaliação do efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos..... 47
Tabela 3. Efeito de inibição (%) do crescimento exercido pelas cepas de *Lactobacillus* sobre *Streptococcus agalactiae* 59
Tabela 4. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A1 (*L. acidophilus* ATCC 4356)..... 63
Tabela 5. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A2 (*L. casei* ATCC 7469) 64
Tabela 6. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A3 (*L. delbrueckii* UFV H2B20) 65
Tabela 7. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A4 (*L. fermentum* ATCC 9338)..... 66
Tabela 8. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A5 (*L. plantarum* ATCC 8014)..... 67
Tabela 9. Parâmetros referentes à avaliação da inocuidade da formulação A6 (*L. paracasei* ST11) 68
Tabela 10. Parâmetros referentes à avaliação da inocuidade da formulação A7 (*Pool*) 69
Tabela 11. Valores médios dos parâmetros avaliados no experimento com o Grupo B1. 75
Tabela 12. Micro-organismos presentes no leite dos animais do grupo B1..... 76
Tabela 13. Valores médios dos resultados de Contagem de Células Somáticas (CCS) medida no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2. 78
Tabela 14. Frequência dos escores de CMT observados no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2..... 79
Tabela 15. Valores médios de condutividade elétrica do leite resultante da avaliação de inocuidade da formulação B2. 79
Tabela 16. Frequência de alterações no aspecto do leite observados no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2. 80
Tabela 17. Número de amostras de leite contaminadas por *Staphylococcus* spp observada nas amostras de leite dos tetos avaliados no estudo de inocuidade da Formulação B2. 81

Sumário

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 Situação da Pecuária Leiteira 18
2.2. Mastite 20
2.2.1 Epidemiologia da mastite 22
2.2.2 Mastite no sistema orgânico de produção 24
2.2.3 Patógenos relacionados à mastite 26
2.2.4 Formas de tratamento 31
2.3 Probióticos 34
2.3.1 Mecanismos de ação dos micro-organismos probióticos 35
2.3.2. Ação de micro-organismos probióticos sobre patógenos 37

3. MATERIAL E MÉTODOS 43
3.1. Micro-organismos 43
3.1.1 – Cepas probióticas 43
3.1.2 – Cepas patogênicas 44
3.2 Animais e manejo 44
3.3 Formulações probióticas 44
3.3.1 - Formulação A 44
3.3.2 Formulação B 46
3.4. Delineamento experimental para avaliação in vitro do efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos. 46
3.4.1 Avaliação do efeito de inibição pela técnica de difusão em ágar. 47
3.4.2 Avaliação do efeito de inibição pela técnica de co-cultura. 49
3.5. Avaliação da inocuidade das preparações probióticas 50
3.6 Métodos Analíticos 52
3.6.1 – Determinação da população de *Lactobacillus* 52
3.6.2 – Determinação da população de células patogênicas 52
3.6.3 - Medida do halo de inibição 52
3.6.4 - Quantificação por qPCR. 53
3.6.5 Avaliação dos parâmetros fisiológicos dos animais e qualidade do leite 55
3.7 Análise estatística dos resultados 56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
4.1 Avaliação in vitro do efeito de inibição das cepas patogênicas por *Lactobacillus*. 57
4.1.1 Difusão em ágar. 57
4.1.2 Co-cultura 58
4.3. Avaliação da inocuidade das formulações probióticas 62
4.3.1 Formulação A 62
4.3.2 Formulação B 72
Grupo B1 72
Grupo B2 77

5 CONCLUSÕES 82

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS 83

REFERÊNCIAS 84

APÊNDICES 96

ANEXO 108

1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto de grande importância na alimentação humana, não apenas nos primeiros anos, mas também durante toda a vida do indivíduo, sendo fonte de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Nos últimos anos tem sido observado o aumento na produção e no consumo de leite e derivados.

Dentre as preocupações dos produtores do setor leiteiro destacam-se aquelas relacionadas à qualidade do leite e sua influência direta no valor recebido pelo produto, de acordo com parâmetros microbiológicos, nutricionais e físico-químicos estabelecidos na legislação. Desta forma, torna-se necessária a obtenção e o fornecimento de um produto seguro à população.

As diversas variáveis que interferem na qualidade do leite estão presentes em todas as etapas de sua produção, que abrangem desde a produção até a comercialização deste produto. Neste contexto vale destacar o tipo de manejo, a dieta à qual o gado leiteiro é submetido, o estágio da lactação, a raça do animal, dentre outros. Estes fatores influenciam diretamente a composição físico-química e microbiológica do leite, que interferem diretamente no seu valor nutricional com ênfase nos teores de sólidos, gordura, lactose, minerais e proteínas. No tocante à qualidade microbiológica do leite é válido ressaltar que a higiene durante a ordenha, o armazenamento e transporte em condições adequadas e o grau de sanidade do rebanho são fatores preponderantes.

Em relação ao grau de sanidade do rebanho destaca-se que, dentre as várias doenças que acometem o gado leiteiro e ameaçam a cadeia produtiva do leite, a mastite, que consiste na inflamação da glândula mamária, merece atenção por ser uma doença que acomete grande parte do rebanho leiteiro mundial.

Além do elevado custo do tratamento desta enfermidade, destacam-se outros problemas causados pela mastite, tais como o descarte do leite contaminado, a perda da produtividade, o efeito negativo sobre a indústria de laticínios, a possibilidade de lesão irreversível causando perda do quarto mamário e, em casos extremos, a morte do animal.

Dentre os agentes causadores da mastite, destacam-se o *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus agalactiae* e o *Streptococcus uberis* como os patógenos de maior importância, sendo responsáveis por grande parte das ocorrências de

intoxicações alimentares, tornando-se, portanto, motivo de preocupação para as autoridades sanitárias, por representarem grave ameaça à saúde pública.

No Brasil, a legislação tem sido atualizada para adequar o setor leiteiro às exigências do mercado mundial. Em 2002, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa n° 51 (BRASIL, 2002), que estabelece novos parâmetros de qualidade para o leite, sendo esta posteriormente modificada dando origem à Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011).

Para se adequar às diretrizes da legislação e atender as exigências do mercado externo é necessário promover avanços na infraestrutura da cadeia produtiva do leite, mediante a implementação de novas tecnologias na obtenção e armazenamento em nível de propriedade rural, bem como e treinamento de pessoal.

Com a crescente demanda por produtos livres de antibióticos, o momento é oportuno para a investigação e desenvolvimento de produtos e técnicas alternativas à antibioticoterapia e que sejam eficazes no tratamento da mastite bovina, com destaque para aquelas à base da fitoterapia, homeopatia e alimentos funcionais.

Neste contexto, vale salientar que os antibióticos, empregados no tratamento convencional da mastite bovina apresentam desvantagens como longo período de carência, preço elevado e a possibilidade do surgimento de cepas resistentes, o que influencia na qualidade e no preço do produto final**.**

Uma das alternativas para este tratamento consiste na utilização de produtos constituídos por espécies de micro-organismos que apresentam propriedades probióticas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, produtos probióticos podem ser definidos como aqueles que, quando administrados em quantidade adequada, promovem benefícios ao hospedeiro, tendo em vista os diferentes mecanismos de ação apresentados por certas espécies de micro-organismos. As vantagens do uso de probióticos incluem a eliminação do período de carência, a modulação do sistema imunológico dos animais, o aumento da resistência às infecções, mediante fixação na parede intestinal e exclusão competitiva, dentre outros mecanismos. Neste contexto, é válido mencionar que muitas destas espécies interferem diretamente na atividade de muitas espécies patogênicas, por diferentes mecanismos de ação.

Especificamente sobre a mastite, alguns autores têm investigado o potencial de micro-organismos probióticos no tratamento desta infecção considerando que algumas destas espécies apresentam efeito de inibição sobre aquelas causadores da doença (CRISPIE et al., 2008; FROLA et al. 2012; SOLEIMANI et al. 2010).

Diante do exposto, no presente estudo considerou-se como hipótese que espécies de *Lactobacillus* probióticos apresentam efeito de inibição sobre cepas de micro-organismos causadores de mastite em vacas leiteiras. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de técnicas alternativas para o tratamento de mastite bovina. Especificamente, avaliou-se, *in vitro*, o potencial antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus* que apresentam propriedades probióticas frente ao desenvolvimento de patógenos isolados do leite de animais acometidos por mastite. Posteriormente, foram desenvolvidas formulações probióticas, para aplicação intramamária contendo as cepas selecionadas, as quais foram devidamente avaliadas *in vivo.*

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Situação da Pecuária Leiteira

O leite bovino é o quinto alimento mais produzido no mundo. Durante o ano de 2013, a produção mundial atingiu a marca de mais de 635 milhões de toneladas, o que representou faturamento de aproximadamente US$ 198 bilhões de dólares. Em nível mundial, o rebanho bovino leiteiro tem cerca de 269.877.000 cabeças, o que representa produtividade média de 2352 kg de leite por animal ao ano (FAO, 2015).

Em 2013 no Brasil, contendo a segunda maior população de bovinos de leite e considerado o quinto maior produtor em nível mundial, a produção de leite ultrapassou 34,2 milhões de toneladas gerando um faturamento de US$ 10,7 bilhões, correspondendo a aproximadamente 0,47% do Produto Interno Bruto – PIB (FAO, 2015).

Dados do IBGE mostram que a região Sudeste lidera o *ranking* em relação ao tamanho do rebanho e da produção no Brasil (34% e 35,5%, respectivamente), seguida pela região Sul (17,6% e 31,3%), Centro-Oeste (15,9% e 14,5%), Nordeste (21,5% e 13,0%) e Norte (11,3% e 5,7%) (IBGE, 2012).

Com o objetivo de promover a melhoria da qualidade do leite e aumentar a competitividade dos produtos lácteos produzidos no país, em 1996 foi criado o Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). Este conjunto de ações teve por objetivo estimular avanços no setor lácteo brasileiro, adequando-o às exigências do mercado mundial, e assegurar que o produto fornecido ao consumidor apresentasse padrão de qualidade internacional, garantindo a saúde da população (ALVIM, 2007). O grupo de trabalho do PNMQL é constituído por representantes da cadeia produtiva e de órgãos governamentais reguladores do setor agrícola, com o objetivo de manter atualizadas as diretrizes do programa (BRASIL, 2011).

Em 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa N° 51 (IN 51), a fim de substituir e modernizar a legislação brasileira sobre os produtos lácteos e derivados, regulamentados pelo

RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) – datado de 1952.

Dentre as regras que regem a produção e o beneficiamento do leite, a IN nº 51 – 2002 do MAPA prevê a redução gradual dos valores de referência para os testes que atestam a qualidade microbiológica e físico química do leite, além de considerar a sanidade do rebanho visando garantir a segurança do consumidor. O teste de Contagem Padrão em Placas (CPP) teve seu valor de referência reduzido de 1×10^6 para 1×10^5 UFC/mL e a Contagem de Células Somáticas (CCS) de 1×10^6 para 4×10^5 células/mL. Além disso, estabelece que os teores de antibióticos no leite cru refrigerado devem obedecer aos Limites Máximos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002).

Com o objetivo de adequar a IN n° 51 à realidade atual, em dezembro de 2011, o MAPA publicou a Instrução Normativa N° 62, por meio da qual estabelece que o leite de consumo seja classificado em Tipo A, pasteurizado e UHT, extinguindo os Tipos B e C. Entretanto, a principal modificação reside na prorrogação dos prazos para entrar em vigor os valores definitivos de CPP e CCS no leite cru resfriado, atualmente em 600.000 células / mL, para julho de 2016 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e julho de 2017 para as regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2011). A Contagem Bacteriana Total (CBT) é uma medida direta de contaminação do leite e estima as condições de higiene no processo de obtenção e armazenamento, bem como limpeza dos equipamentos e a presença de infecção no quarto mamário (BOZO et al., 2013). A Contagem de Células Somáticas (CCS) é uma importante ferramenta de monitoramento da qualidade do leite pela estimativa do grau de sanidade do rebanho, com o indicativo da presença de mastite subclínica, o que causa perdas, tanto quantitativa como qualitativa (SANTOS, 2003).

Portanto, para que a qualidade do leite produzido esteja dentro dos padrões estabelecidos na legislação é essencial que se observe os procedimentos nas Boas Práticas de Produção com ênfase no emprego das técnicas de higiene pessoal, do ambiente e nos equipamentos utilizados no processo, além do grau de sanidade do rebanho.

No tocante aos valores de CCS, tem sido observado que os mesmos são fortemente influenciados por fatores ambientais tais como umidade e temperatura, e fatores intrínsecos como tipo de manejo, método de amostragem, tamanho do rebanho, tempo entre a coleta e a análise do leite, idade do animal, número de partos**,** ocorrência de mastite, nível de infecção da glândula mamária, nível de produção de leite e estágio da lactação (BRITO et al, 1999; PAULA et al. 2004; RANGEL et al., 2009;).

2.2. Mastite

A mastite, ou mamite, é a inflamação da glândula mamária, que ocorre em um ou mais quartos mamários, comumente durante o período de lactação, e está relacionada à infecção intramamária causada majoritariamente por espécies de estafilococos e estreptococos, dentre outras (CHEBEL, 2007; ARROYO, 2010).

De acordo com Teixeira et al. (2008), do ponto de vista clínico, a mastite pode ser classificada como **mastite clínica**: quando observam-se sinais clínicos como hipertermia, vermelhidão, inchaço e dor no úbere, além da secreção de grumos no leite; ou como **mastite subclínica**: quando não se evidenciam sinais externos, podendo apenas ser diagnosticada por meio de testes como o California Mastitis Test (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS).

Hospido e Sonesson (2005) ainda incluem a **mastite crônica** como uma terceira categoria, aquela cujo processo inflamatório tenha se prolongado por meses e que pode se estender de uma lactação para outra.

Apesar dos esforços realizados pelas autoridades sanitárias para a melhoria da qualidade do leite, a mastite é a doença que mais afeta a produção de leite e causa prejuízo para o setor, acometendo grande parte do rebanho leiteiro mundial (BRADLEY, 2002; PEIXOTO 2009; WATTS, 1988).

Rajala-Schultz et al. (1999), em estudo com 24.276 vacas da raça Ayrshire finlandesas, sadias ou diagnosticadas apenas com mastite, em período de uma

lactação, verificaram que a redução da produtividade em leite durante os 305 dias de lactação variou entre 1,8 e 7,4%.

Deluyker et al. (1993) analisaram o rendimento diário em leite e a CCS a cada 48 horas em 117 vacas durante 119 dias pós-parto e constataram a queda de 5% no rendimento da lactação relacionada com a ocorrência da mastite clínica. Os autores ainda verificaram que os animais com CCS acima de 245.000 células/mL apresentaram perda de 6,2% no rendimento quando comparados com vacas com CCS inferiores a 90.000 células/mL.

De acordo com Holanda Junior et al. (2005) o prejuízo causado pela mastite equivale a aproximadamente US$ 126,00 por animal ao ano. Por sua vez, Fonseca e Santos (2000) estimaram que o gasto gira em torno de US$ 184,00 por vaca ao ano, e que 30% da ocorrência de casos são de mastite clínica e 70% mastite subclínica. De acordo com Peixoto et al. (2009) e Barbosa et al. (2009) os prejuízos são causados pelo descarte do leite, descarte do animal, diminuição da produção em caso de perda do teto, custos com medicamentos, serviços veterinários e mão de obra para medidas profiláticas e curativas.

Embora os estudos foquem apenas na parte econômica da mastite, o impacto ambiental também é um fator significativo. O descarte do leite contaminado incrementa o impacto ambiental por litro de leite produzido. Se a incidência de mastite fosse reduzida, a mesma quantidade de leite seria produzida em menos tempo e por menos animais. Consequentemente, menos alimento seria necessário para manter os níveis de produção. Desta forma, com o aumento do número de animais, há maior produção de substâncias que contribuem para a acidificação do solo, eutrofização das águas e gases que provocam o efeito estufa (HOSPIDO; SONESSON, 2005).

Pesquisas concernentes aos fatores que predispõe o rebanho leiteiro à mastite clínica e/ou subclínica tem revelado que as condições de higiene do úbere, dos tetos e do ambiente, bem como a pastagem são preponderantes, além das práticas de manejo e ordenha (BARKEMA et al., 1999; PINHO MANZI et al., 2012; RUEGG, 2006; SCHREINER; RUEGG, 2003).

De acordo com Schukken et al. (1990), o aumento da falta de higiene dos estábulos pode elevar em até 90% o risco de mastite clínica no rebanho. Esta condição pode ser agravada em caso de aumento da exposição dos animais aos patógenos, que incluem a superlotação do estábulo, consistência das fezes,

frequência da limpeza e renovação das camas, bem como a higiene dos locais de passagem dos animais que possibilitam o acesso a áreas externas. (RUEGG, 2006). Segundo Barkema et al. (1999) outros fatores de risco que apresentam influência sobre a incidência de mastite clínica incluem o grau de higiene das botas dos operários, uso de água de poço em detrimento da água do sistema público, espessura da palha e limpeza da cama na sala de parto, sistema semi-automático de remoção de teteiras após a ordenha, dentre outros.

No tocante à sanidade dos animais, o aumento em 1 ponto no escore de hiperqueratose e de higiene do úbere foi associado à elevação da probabilidade de infecções intramamárias em 30% e 47%, respectivamente (PINHO MANZI et al., 2012). Quanto à higiene de pernas e de úbere, Schreiner e Ruegg (2003) constataram associação significativa entre o escore do úbere e a prevalência de infecções intramamárias, tanto por patógenos contagiosos como ambientais, sendo que, em uma escala de 1 (mais limpo) a 4 (mais sujo), os animais que apresentaram valores de escores de limpeza de úbere equivalentes a 3 e 4 apresentaram probabilidade 50% maior de contrair infecção pelos principais patógenos quando comparados com os animais que apresentaram valores de escore 1 e 2.

2.2.1 Epidemiologia da mastite

Estudos revelam considerável variação nas taxas de prevalência da mastite bovina, sendo que a maior parte dos casos são representados pela mastite subclínica (BELOTI et al., 1997; BRANT; FIGUEIREDO, 1994; OLIVEIRA et al., 2011; MARTINS et al., 2010). Estes números também apresentam grande variação para vacas primíparas (SANTMAN-BERENDS et al., 2012).

Santman-Berends et al. (2012) investigaram a incidência de mastite subclínica nos primeiros 100 dias de lactação em vacas primíparas, oriundas de 173 rebanhos da Holanda. Os resultados revelaram que, em média, 25,5% das vacas apresentaram mastite subclínica e, que esta foi prevalente em todos os rebanhos avaliados.

Santman-Berends et al. (2015) avaliaram dados de 227 rebanhos na Holanda, com o objetivo de estimar a taxa de incidência de mastite clínica (CMI) para os rebanhos do país. Os autores constataram que o modelo estatístico utilizado estimou o CMI em 32,5 casos para cada 100 animais/ano (Intervalo de confiança de 95 % = 30,2 a 34,8) , o que corroborou os dados obtidos na prática – 33,4 casos / 100 animais ao ano (IC de 95 % = 29,5 – 37,4). Esta avaliação revelou uma predição precisa da taxa de incidência de mastite clínica possibilitando assim o monitoramento dos rebanhos e incentivo aos proprietários no tocante ao investimento contínuo na saúde de seus rebanhos.

Oliveira et al. (2013) caracterizaram os casos de mastite clínica ocorridos em vacas de 50 grandes rebanhos no estado de Wisconsin – EUA, contendo no mínimo 200 animais. Os resultados das análises microbiológicas revelaram que 747 animais apresentaram algum grau de mastite clínica, sendo que os patógenos mais comuns encontrados foram a *Escherichia coli* (22,6 %), seguidos de estreptococos ambientais (12,7 %), *Klebsiella* spp. (6,9 %), *Staphylococcus* coagulase negativo (6,0 %) e *Staphylococcus aureus* (2,8 %).

É possível observar que não foi detectada a presença do *Streptococcus agalactiae* como patógeno causador de mastite, tendo em vista a erradicação deste patógeno naquele estado americano (RUEGG, 2014).

No Brasil, Oliveira et al. (2015) analisaram 9912 animais de 8 rebanhos leiteiros localizados no estado de Minas Gerais, durante 65 meses – entre janeiro de 2009 e maio de 2014 – e observaram 31755 casos de mastite clínica, dos quais 11914 foram considerados como “novos casos”, sendo que em 2907 (24,4 % dos novos casos) houve crescimento bacteriano. Excluindo os casos repetidos, a incidência média foi de aproximadamente 27 % ao ano para novilhas e 31 % em vacas multíparas. Os patógenos mais frequentemente isolados foram coliformes (19 %), seguidos de estafilococos coagulase negativo (9 %), estreptococos (5 %), *Streptococcus uberis* (5 %) e *S. agalactiae* (4 %).

Fávero et al. (2015), durante 1 ano, avaliou 3 rebanhos com um total de 231 animais e observaram que a prevalência média de mastite subclínica variou entre 40,9 % e 45,7 %, tendo alcançado nívele máximo de 60 % em uma das 3 propriedades avaliadas. Dentre os patógenos mais frequentemente isolados destacam-se o *Streptococcus agalactiae* (22,7 % na propriedade B) e *Corynebacterium bovis (*17,7% na propriedade A e 26,0 % na propriedade C)

Beloti et al. (1997) avaliaram a incidência de mastite subclínica em 503 vacas da raça holandesa, de rebanhos localizados na região norte do Paraná. Dentre os animais examinados, 150 (29,82%) apresentaram resultado positivo ao CMT, totalizando 295 quartos mamários. Destes, em 223 (75,59%) amostras houve o crescimento bacteriano, dentre os quais 17,97% causados por *Staphylococcus aureus*, 12,54% por *Staphylococcus* coagulase negativo e 21,69% por *Streptococcus* spp.

Brant; Figueiredo (1994) avaliaram a prevalência de mastite subclínica em 425 quartos mamários de 112 vacas, oriundas de 4 rebanhos localizados em Minas Gerais, e verificaram que a média dos rebanhos foi de 42,82%.

Oliveira et al. (2011) avaliaram a prevalência de mastite subclínica em 237 vacas, pertencentes a 9 rebanhos localizados no estado do Pará. Dentre os 935 quartos avaliados, 6,6% apresentaram mastite subclínica e 1,3% dos quartos tinham mastite clínica.

Martins et al. (2010) verificaram a prevalência e a etiologia infecciosa da mastite bovina em propriedades leiteiras da região de Cuiabá, no estado do Mato Grosso. Foram coletadas 279 amostras de leite, oriundas de 108 animais, pertencentes a 5 rebanhos. Dos animais examinados, 92 (85,2 %) eram portadores de mastite em pelo menos um quarto mamário e, o percentual de quartos afetados por mastite clínica e subclínica era de 5,8 % e 65 %, respectivamente. Em relação à etiologia da mastite subclínica, a espécie *Corynebacterium* spp. foi isolada em 27,6% e a espécie *Staphylococcus aureus* foi isolada em 21,5% das amostras.

2.2.2 Mastite no sistema orgânico de produção

Dentre as diferentes tecnologias de produção de leite, destaca-se a pecuária orgânica, uma alternativa que preconiza o equilíbrio entre o meio ambiente, o ser humano e o bem estar animal, visando oferecer à população alimentos saudáveis e seguros, isentos de aditivos químicos e biológicos, tais como antibióticos, vermífugos e hormônios (SOARES et al., 2006).

Neste contexto, vale salientar que o aumento do poder aquisitivo, bem como o acesso à informação, tem levado os consumidores a se interessarem por alimentos orgânicos, dentre os quais destacam-se o leite e seus derivados. Segundo Langoni et al. (2009), a procura por produtos orgânicos cresce em meio à preocupação dos consumidores com relação ao consumo de alimentos transgênicos, sobretudo na Europa, e com a garantia da segurança e qualidade dos alimentos. De acordo com os autores, o relatório da Conferência das Nações Unidas para o Comércio e o Desenvolvimento sugere uma taxa de crescimento entre 10 % e 30% para o mercado de produtos orgânicos nos próximos anos em países industrializados.

Pol e Ruegg (2007) analisaram o leite de quartos mamários individuais em vacas de rebanhos do estado de Wisconsin – EUA, e verificaram que no sistema orgânico de produção (n = 2334 quartos, 5,4% *S. aureus* e 2,3% *Streptococcus agalactiae*), a incidência de mastite causada por agentes contagiosos é significativamente superior, quando comparada com o sistema convencional (n = 3338 quartos, 2,9% *S. aureus* e 0,9% *S. agalactiae*)

Langoni et al. (2009) avaliaram os aspectos citológicos e microbiológicos do leite produzido em sistema orgânico em propriedades no município de Botucatu – SP. O estudo foi conduzido em um total de 150 amostras de leite de 4 propriedades, utilizando como parâmetros de avaliação a CCS e a contagem de UFC/mL em amostras individuais de leite de vacas com pelo menos um teto positivo ao CMT. Os resultados demonstram que dos 150 quartos avaliados, 66 (44%) apresentaram resultado positivo ao CMT, sendo 25 quartos infectados com *Corynebacterium bovis* e 12 com *Staphylococcus aureus*. Além da mastite causada por agentes contagiosos, houve ainda isolamento de patógenos ambientais, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, no leite de latões das propriedades, indicando a necessidade da educação sanitária para a obtenção higiênica do leite.

Ribeiro et al. (2009) investigaram a presença de micro-organismos patogênicos, sua influência na CCS, a sensibilidade e a multirresistência dos isolados a antibióticos e, a presença de resíduos de drogas no leite de vacas, com e sem mastite, produzidos no sistema orgânico, em 4 pequenas propriedades localizadas no interior do estado de SP. As amostras foram coletadas de 148 animais no período médio da lactação, 74 animais com mastite subclínica e 74

animais sadios, utilizados como controle. Dentre os animais doentes, 19 (25,7%) apresentavam infecção por *S. aureus*, 15 (21,4%) por *Streptococcus* spp. e 3 (4,3%) estavam infectados com *S. agalactiae*.

Em relação à resistência, os patógenos foram submetidos a provas de sensibilidade pelo método de difusão com discos. Foram utilizados os principais antibióticos comerciais recomendados para o tratamento intramamário ou parenteral da mastite bovina, ampicilina, cefoperazona sódica, ceftiofur, enrofloxacina, gentamicina, neomicina, oxacilina e penicilina. Os micro-organismos eram considerados multirresistentes quando apresentassem resistência a 3 ou mais drogas. Dos antimicrobianos testados, a penicilina, ampicilina e neomicina foram as substâncias às quais os micro-organismos apresentaram as maiores taxas de resistência, 53,5%, 41,6% e 38,6%, respectivamente. Das 101 linhagens testadas, em 40 (39,6%) foi observada a ocorrência de multirresistência. De forma adversa ao resultado esperado para animais criados em sistema orgânico, foram encontrados resíduos de antibióticos em amostras de leite de 4 vacas, o que contraria a legislação vigente e coloca em risco a saúde dos consumidores (RIBEIRO et al., 2009).

No Brasil, a produção de leite orgânico, ainda insuficiente para suprir a demanda, evidencia a necessidade de tecnologias que contribuam para minimizar os resíduos de medicamentos no leite e derivados (MARTIN, 2011).

2.2.3 Patógenos relacionados à mastite

Em relação à transmissão da doença, a mastite pode ser classificada de duas formas principais, a saber: contagiosa: aquela cuja transmissão se dá por meio do contato entre os animais e/ou contato com equipamentos de ordenha contaminados e operadores, e cujos agentes etiológicos principais pertencem às espécies *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp; e ambiental: aquela que é transmitida pelo ambiente com os quais o animal entra em contato, tais como locais de ordenha, meio ambiente e repouso, causada principalmente por bactérias do grupo dos

coliformes e das espécies *Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus faecalis*, dentre outras. Existem ainda, agentes que são classificados como oportunistas e outros. Os micro-organismos classificados como “outros” são os que apresentam menor incidência e provocam uma leve elevação na CCS (NICKERSON, 2011).

2.2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Em relação aos agentes causadores da doença, foram identificadas 137 espécies, subespécies e sorotipos de micro-organismos isolados da glândula mamária de bovinos, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie de maior incidência (WATTS, 1988; FROLA et al. 2012).

Os indivíduos da espécie *S. aureus* são micro-organismos anaeróbios facultativos, Gram positivos, hemolíticos, coagulase e catalase positivos (TEIXEIRA et al., 2008).

As infecções causadas por *S. aureus* são, mais frequentemente, de natureza subclínica, com ocorrências periódicas de sintomas clínicos (NICKERSON, 2011).

Em um estudo realizado por Brito et al. (1999) com 6315 amostras de leite de 48 rebanhos localizados no estado de Minas Gerais, verificou-se que 98% dos rebanhos analisados apresentavam infecção pelo *S. aureus*. E ao nível de quartos mamários, de todas amostras coletadas, 3919 apresentaram diferentes nível de infecção, sendo 19,2 % causados por *S. aureus*.

Souza et al. (2009) avaliaram a qualidade microbiológica e sua influência sobre a CCS em 3749 amostras de leite, coletadas em 24 rebanhos da região serrana do estado do Rio de Janeiro e Zona da Mata em Minas Gerais. Os resultados revelaram que em 2614 amostras (69,7%) foi identificada ao menos um patógeno da mastite. Das amostras positivas, em 790 (30,2%) o micro-organismo isolado foi o *S. aureus*, e a média da CCS nas amostras de leite de glândulas infectadas foi de 966.000 células/mL, média 266% superior àquela encontrada nas amostras de leite que não apresentaram crescimento de patógeno (264.000 células/mL).

2.2.3.2 *Streptococcus agalactiae*

São bactérias Gram positivas, não hemolíticas, catalase negativa. São patógenos contagiosos, que tem como reservatório principal os quartos mamários infectados. Porém é facilmente encontrado também na mão do ordenhador, no pano de limpeza dos tetos e em teteiras do sistema de ordenha. Com elevada taxa de disseminação, em casos de mastite aguda, em um tanque contendo o leite de 100 vacas, o leite de apenas uma vaca infectada é o suficiente para elevar a CCS do tanque em mais de 100.000 células/mL (NICKERSON, 2011; TEIXEIRA et al., 2008).

No estudo conduzido por Souza et al. (2009), os resultados revelaram que das 2614 amostras de leite de glândulas infectadas, em 551 (21,1%) o patógeno era o *S. agalactiae*, e ainda, que este foi responsável pela maior aumento da CCS, com média de 1.520.000 células/mL.

Lopes Junior et al. (2012) investigaram a relação entre a contagem total de bactérias e células somáticas em quartos mamários infectados por mastite. As amostras foram coletadas em 638 tetos de vacas de 5 propriedades leiteiras localizadas em Minas Gerais. Os resultados demonstraram que as amostras de leite de glândulas infectadas por *S. agalactiae* foram a que apresentaram maior CCS (1.572.000 células/mL) e contagem bacteriana total (333.000 UFC/mL).

2.2.3.3 *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis é uma espécie classificada como um patógeno de origem ambiental, que apresenta como uma de suas principais características o fato de estar universalmente difundido na propriedade em caso de infecção, uma vez que são encontrados não apenas no ambiente, mas também no trato gastrointestinal dos animais, em seu sistema mamário, na pele e nos pelos. Assim, este patógeno tem facilidade de provocar mastite em vacas em lactação, em vacas secas, primíparas ou multíparas, podendo esta inflamação se desenvolver na forma clínica ou subclínica e causar infecção persistente sem provocar elevação da contagem de células somáticas (OLIVER, PIGHETTI, ALMEIDA, 2011; PADUCH 2013). Estes micro-organismos apresentam α ou γ-hemólise quando cultivado em ágar sangue (KROMKER et al., 2014).

Embora seja considerado um patógeno ambiental, Davies et al. (2015) estudaram a epidemiologia do *S. uberis* em 52 rebanhos no Reino Unido por um período de 12 meses. Os autores mostraram que *S. uberis* contribuiu em mais de 50 % dos casos de mastite clínica em 33 % dos rebanhos estudados, o que sugere que este tipo de transmissão pode representar um obstáculo importante no estabelecimento de protocolos de controle deste patógeno, pois esta espécie apresenta comportamento tanto de um patógeno ambiental quanto de um contagioso.

2.2.3.4 *Streptococcus dysgalactiae*

Os membros desta espécie caracterizam-se por serem Gram positivos, hemolíticos e negativos à prova da catalase (NICKERSON, 2011; TEIXEIRA, 2008).

Embora o *S. dysgalactiae* seja considerado um patógeno ambiental, Teixeira et al. (2008) afirmam que o agente pode ser considerado simultaneamente ambiental e contagioso, pois esta espécie apresenta capacidade de sobrevivência no tanto ambiente como nas amígdalas dos animais, neste caso, sendo transmitida pelo contato entre a boca do bezerro e o teto.

As infecções intramamárias causadas por *S. dysgalactiae* são caracterizadas pela persistência da infecção e pela baixa resposta a medidas de controle convencionais. Sabe-se, também, que este patógeno adere a células mamárias e a proteínas extracelulares, porém, não foram encontrados fatores de virulência que pudessem explicar as características da infecção. Esta persistência pode estar associada à habilidade do patógeno em invadir as células epiteliais do tecido mamário. (ALMEIDA; OLIVER, 1995).

Em um estudo conduzido por Langoni et al. (2011), foram avaliados os aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. Foram coletadas amostras de 1090 quartos mamários de 283 vacas da raça Holandesa em lactação, primíparas e multíparas, de 10 propriedades do interior do estado de São Paulo. Os resultados revelaram a ocorrência de mastite subclínica em 210 quartos examinados. Destes, em 62 casos (29,52%) a infecção era causada por *Corynebacterium bovis*, seguido do *Streptococcus dysgalactiae* com 25 casos (11,9%) e *Staphylococcus aureus* com 22 (10,48%). Nos 8 casos diagnosticados

de mastite clínica houve predominância de ocorrências causadas por *S. dysgalactiae* (3 casos), tanto na forma isolada (1), como associada ao *S. agalactiae* (1) e *S. aureus* (1).

2.2.3.5 Outras espécies

Além dos principais patógenos causadores de mastite, outras espécies desempenham importante papel na epidemiologia das infecções intramamárias, destacando-se patógenos ambientais como *Streptococcus dysgalactiae*, os coliformes, tais como *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*, e os menos frequentes como *Enterobacter, Pasteurella, Pseudomonas, Serratia* e *Proteus*. Alguns destes gêneros, tais como *Serratia* e *Pseudomonas* apresentam resistência frente aos compostos antimicrobianos utilizados nos procedimentos de pré e pós *dipping* e sanitizantes utilizados rotineiramente em propriedades leiteiras na desinfecção dos tetos e mangueiras do sistema de ordenha (OLIVER, PIGHETTI, ALMEIDA, 2011; PADUCH 2013).

Em estudo conduzido em rebanhos na Itália durante os anos de 2010 e 2011 Barberio et al (2013) identificaram 99 cepas diferentes de bactérias Gram-negativa, sendo 53 *E. coli*, 28 *Klebsiella* spp., 14 *Serratia* spp., 2 *Enterobacter* spp. e 2 *Citrobacter* spp.

Nam et al. (2009) estudaram a prevalência e a susceptibilidade de bactérias Gram-negativas em 20386 amostras de leite obtidas em 552 rebanhos na Coreia do Sul durante 6 anos, tendo sido isoladas 841 cepas diferentes, compreendendo 19,1 % *E. coli*, 6,7 % *Klebsiella pneumoniae*, 6,4 % *Enterobacter cloacae*, e 2,0 % *Citrobacter*. Os autores contataram que 70 % das bactérias isoladas apresentaram resistência a mais de 3 antibióticos testados no estudo.

As bactérias pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) também têm importante papel na epidemiologia de mastite. Ainda que não sejam considerados patógenos principais como os coagulase-positivo, este grupo é formado por mais de 50 espécies, das quais 10 podem provocar o surgimento da mastite. Sua relevância se destaca pelo substancial aumento de CCS em tanques de estocagem e por ocorrências de casos moderados de mastite clínica (VLIEGHER, 2013; SCHUKKEN et al., 2009)

2.2.4 Formas de tratamento

As práticas de prevenção da mastite fazem parte do Plano de Cinco Pontos, preconizado pelo National Mastitis Council (NMC) dos EUA, que compreende o emprego de higienização dos tetos pré-ordenha, pós *dipping*, terapia em vaca seca, manutenção, funcionamento e operação apropriada do equipamentos de ordenha e, tratamento apropriado dos casos clínicos (RENEAU, 2001). De forma semelhante, a National Institute for Research in Dairying, da Inglaterra, recomenda o monitoramento dos mesmos fatores, na tentativa de minimizar o risco de mastite (O'ROURKE, 2005).

Middleton (2013) preconiza a segregação de animais infectados para evitar a disseminação do *S. aureus* no rebanho, e aponta a higiene durante a ordenha como a principal medida de controle da mastite. O autor ainda destaca a vacinação como uma medida de controle, mas ressalta que nenhuma vacina conseguiu prevenir as infecções intramamárias causadas por *S. aureus* de forma consistente.

Em relação ao tratamento da mastite, os métodos convencionais se baseiam na utilização de protocolos de tratamento à base de antibióticos e suas associações, tais como ampicilina com cloxacilina ou ainda, penicilina procaína com diidroestreptomicina, dentre outros (FROLA et al., 2012, ROYSTER; WAGNER, 2015; PILLAR et al., 2014; REYES et al., 2015; MILNE et al., 2005).

Roberson (2012) destaca a existência de diversas formas de tratamento da mastite clínica e que por outro lado são escassos os estudos científicos que demonstrem a eficácia da maioria destes tratamentos. Ressalta ainda que cerca de 50 % dos casos são tratados de forma desnecessária e inapropriada. Ademais, Pol e Ruegg (2007) afirmam que a terapia com antimicrobianos não é necessária no tratamento da mastite clínica. No entanto, Gorden et al. (2013) e Pinzón-Sanchez, Cabrera e Ruegg (2011) constataram que a terapia com antibióticos de aplicação intramamária realizada por tempo estendido pode ser eficaz.

Os protocolos de tratamento convencional preconizam o uso de antibióticos β-lactâmicos derivados da penicilina, tais como amoxicilina, cloxacilina e ampicilina, bem como derivados da cefalosporina: cefapirina, ceftiofur. Outra classe de antibióticos inclui macrolídeos com destaque para pirlimicina (ROYSTER;

WAGNER, 2015), além das tetraciclinas e estreptomicinas (OLIVER; MURINDA, 2012).

No entanto, vale salientar que as desvantagens do tratamento com antibióticos incluem o prejuízo ao produtor, tanto pelo custo dos medicamentos como pelo descarte forçado do leite durante o período de carência do produto (ROYSTER; WAGNER, 2015; NERO et al., 2007) bem como a necessidade de mão de obra treinada para a detecção precoce dos casos de mastite e coleta apropriada de amostra para diagnóstico e definição da terapia adequada. Em relação aos animais, as vacas com mais de 3 lactações e que apresentem histórico de mastite clínica ou de CCS elevada, são indivíduos que não apresentam boa resposta a terapias comumente adotadas (RUEGG, 2014).

Deve-se observar ainda a importância da presença de resíduos de antibiótico no leite, que resulta da inobservância e/ou desobediência ao período de carência do produto, aliada à falta de fiscalização (SILVA et al., 2008). Desta maneira, a conscientização dos produtores é fundamental para prevenir a presença de resíduos de medicamentos no leite, causada pelo uso abusivo e inadequado destas substâncias (NERO et al., 2007), uma vez que até mesmo o grau de instrução dos proprietários influencia indiretamente a qualidade do leite (JOSHI, GOKHALE, 2006). Sousa et al. (2010) avaliaram 30 amostras de leite da região do Cariri, no Ceará, obtidos de animais criados no sistema convencional e constataram que 23 amostras (76,7 %) continham antibióticos em níveis acima do limite permitido pela legislação.

De acordo com Royster; Wagner (2015).não existe uma regra geral para a determinação do período de tempo em que o antibiótico será detectado no leite. Em geral o período de carência destes medicamentos varia entre 24 e 96 horas, de acordo com a farmacocinética do princípio ativo

Do ponto de vista da segurança alimentar, para que os consumidores não sejam expostos a riscos, é necessária a implementação de medidas de controle e prevenção de contaminação da cadeia produtiva por antibióticos, pelo fato destes não serem inativados por tratamentos térmicos aplicados ao leite (ROCA et al., 2011). A presença indesejável destas substâncias no leite traz prejuízos para a indústria de laticínios e graves ameaças à saúde pública (ANDREW et al., 2009; MARTIN, 2011).

Na indústria de derivados, além de resultados falso negativos que induzem a falsa ideia de boa qualidade do leite, os resíduos de antibióticos podem inibir as bactérias láticas utilizadas nos processos fermentativos, comprometendo a produtividade e a qualidade sensorial do produto final (FOLLY; MACHADO, 2001; FONSECA et al., 2009; MARTIN, 2011; NASCIMENTO, 2001).

Em relação à saúde pública, o problema mais frequente do consumo do leite contaminado com antibióticos é a seleção de estirpes resistentes, causada por uma pressão seletiva que favorece o crescimento de espécies com resistência natural ou adquirida, tornando ineficientes tanto as drogas consideradas clássicas como as mais recentes (NASCIMENTO et al., 2001).

Além da seleção de cepas resistentes, destacam-se outros problemas causados pela presença de antibióticos no leite, tais como as reações de hipersensibilidade em indivíduos sensíveis, desequilíbrio na microbiota intestinal dos indivíduos e efeitos teratogênicos (FOLLY; MACHADO, 2001; MARTIN, 2011, NASCIMENTO et al., 2001).

Além das exigências da legislação, relativas à presença de resíduos químicos no leite, existe também a preocupação da sociedade com a preservação do meio ambiente e da biodiversidade, bem como o bem estar animal (SOARES et al. 2006).

Desta forma, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de produtos para tratar a mastite que não deixe resíduos no leite, os quais poderiam ser empregados tanto no sistema convencional quanto no sistema orgânico de produção de leite. Neste contexto, alguns produtos alternativos aos antibióticos têm sido investigados, incluindo fitoterópicos, por intermédio de óleos essenciais de canela, cravo, orégano, manjerona, bergamota, eucalipto, funcho, alecrim, segurelha, tomilho e capim limão (AIEMSAARD et al., 2011; FRATINI et al., 2014), bem como o uso da homeopatia com princípios ativos como *Mercurius solubilis, Lachesis mutus, Sulfur, Calcium carbonicum,* dentre outros (KLOCKE et al, 2010), e sobretudo micro-organismos probióticos (KIJLSTRA; EIJCK, 2006), eliminando desta forma o período de carência.

Lange-Consiglio et al. (2014) avaliaram o efeito do emprego de concentrado de plaquetas sanguíneas (CP) em associação com antibióticos e de forma não associada em animais acometidos com mastite crônica. Os autores constataram que o tratamento empregando plaquetas associadas com antibióticos apresentou

desempenho significativamente superior ao tratamento realizado apenas com antibiótico, sendo que o tratamento utilizando apenas CP apresentou resultados melhores que a antibioticoterapia.

Outras formas de tratamento ainda sob investigação incluem o uso de preparações contendo ozônio (ĐURIČIĆ, VALPOTIĆ, SAMARDŽIJA, 2015) e fotoinativação dos micro-organismos (SELLERA, 2015).

2.3 Probióticos

O conceito de micro-organismos probióticos foi formulado no século XIX, a partir de observações feitas pelo imunologista russo Elie Metchnikoff, ao correlacionar a vida longa e saudável de camponeses búlgaros ao consumo de leites fermentados contendo *Lactobacillus* benéficos, que influenciavam positivamente a saúde do consumidor (DOUGLAS, 2008).

Para que seja considerado probiótico, o micro-organismo deve apresentar as seguintes características: não apresentar toxicidade ou ser patogênico; ser obtido de cepa isolada e identificada taxonomicamente ao nível bioquímico e genético; sobreviver, colonizar o sítio de fixação, o que implica em ser resistente ao suco gástrico e à bile, aderir às células epiteliais e mucosas, competir com a microbiota residente; produzir substâncias antimicrobianas; apresentar antagonismo a bactérias patogênicas; modular o sistema imune do hospedeiro; ser geneticamente estável e; se possível, apresentar propriedades sensoriais agradáveis e tecnológicas desejáveis quando aplicadas em processos industriais (DOUGLAS, 2008; GAGGÌA, 2010).

Segundo FAO/WHO (2001), probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Embora a maior parte das pesquisas com probióticos sejam conduzidas em humanos, a aplicação veterinária destes micro-organismos vem sendo testada (GAGGÌA et al, 2010).

Dentre as espécies que apresentam propriedades probióticas destacam-se as bactérias láticas, que compreendem um grupo heterogêneo de espécies de micro-organismos, naturalmente presente em alimentos e na microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e urogenital de animais (TODOROV et al., 2011). Dentro do grupo das bactérias láticas, o gênero *Lactobacillus* é o que apresenta maior variação, pois compreende mais de 100 espécies, muitas das quais são utilizadas na produção de alimentos fermentados, bem como de produtos probióticos para uso humano e veterinário. Ainda, dentre outros gêneros de micro-organismos probióticos, destacam-se as bactérias dos gêneros *Bifidobacterium, Lactococcus, Leuconostoc, Propionibacterium* e *Bacillus* e as leveduras dos gêneros *Saccharomyces, Pichia* e *Kluyveromyces* (GAGGÌA, 2010).

2.3.1 Mecanismos de ação dos micro-organismos probióticos

Segundo Oelschlaeger (2010) os mecanismos de ação apresentados por espécies de micro-organismos probióticos podem ser classificados em três modalidades diferentes, sendo **a)** antagonismo sobre espécies de micro-organismos residentes da microbiota intestinal de humanos ou animais, sejam comensais ou patógenos; **b)** modulação das imunidades inata e adquirida e; **c)** inibição de toxinas de micro-organismos patogênicos, provenientes de água e alimentos contaminados.

O antagonismo apresentado por micro-organismos probióticos, mecanismo conhecido como exclusão competitiva, pode ser resultante da competição entre as espécies por sítios de fixação na mucosa; competição por nutrientes e fatores de crescimento; e/ou pela atividade metabólica, que pode resultar em produtos como ácidos lático, acético e fórmico, além de etanol e peróxido de hidrogênio (OYETAYO; OYETAYO, 2005; ROLFE, 2000).

Muitas espécies probióticas apresentam ainda, capacidade de produzir substâncias antimicrobianas conhecidas como bacteriocinas. Estes compostos são constituídos de peptídeos ou complexos protéicos, sintetizados por determinadas espécies de bactérias, e tem como principal característica a ação contra bactérias geneticamente similares (TODOROV et al., 2011), sendo inócua sobre a espécie que a produz. (VUYST; LEROY, 2007)

Um outro mecanismo de ação apresentado por espécies probióticas consiste na modulação do sistema imune que resulta no controle de condições infecciosas e inflamatórias no hospedeiro (CRISPIE et al., 2008; REMUS et al., 2011; SCHULZ et al. 2003; TODOROV et al., 2011; VUYST; LEROY, 2007).

A imunomodulação ocorre por meio da interação dos micro-organismos probióticos com células epiteliais e imunes do intestino do hospedeiro. A adesão dos probióticos às células do hospedeiro estimula o sistema imunológico a secretar células de defesa como mononucleócitos, células dendríticas, macrófagos e células epiteliais e citocinas pró-inflamatórias. (OELSCHLAEGER, 2010; REMUS et al., 2011).

Em relação à modulação de processos inflamatórios por probióticos, Grangette et al. (2005) esclarecem que componentes da parede celular de micro-organismos tais como peptidoglicanas, ácidos teicóico e lipoteicóico (LTA), estão envolvidos na indução de fatores pró-inflamatórios, como citocinas, em células intestinais do hospedeiro. Os autores investigaram a influência da composição do LTA da parede celular de *Lactobacillus* na sua capacidade imunomoduladora. Foram testadas duas cepas de *Lactobacillus plantarum*, uma mutante denominada NCIMB8826 e uma cepa selvagem. As células foram submetidas a testes *in vitro* (estimulação de células mononucleares) e *in vivo* (modelo de colite de murina). Os resultados demonstraram que o conteúdo reduzido de D-alanina na composição do ácido lipoteicóico da parede da cepa mutante induziu menor liberação de fatores pró-inflamatórios, em ambos os estudos, *in vitro* e *in vivo*, o que lhe confere um perfil anti-inflamatório, diferentemente do perfil encontrado na cepa selvagem. Os autores destacam a importância da composição do LTA da parede nas ações pró- ou anti-inflamatórias dos *Lactobacillus* e seu potencial para o uso no tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

Alguns trabalhos (FABIAN; ELMADFA, 2006; FABIAN, et. al, 2008; RABOT, et al., 2010; ROLFE, 2000; SADRZADEH-YEGANEH, et al., 2010) enumeram outros benefícios dos probióticos como a produção de metabólitos capazes de quelar toxinas bacterianas e inibir sua ação; estimulam a produção de enzimas que auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, tais como lactase, sacarase e maltase; além da produção de vitaminas e; redução do teor de colesterol sanguíneo, ao inibir a reabsorção intestinal dos sais biliares.

2.3.2. Ação de micro-organismos probióticos sobre patógenos

O potencial apresentado por espécies de micro-organismos probióticos na inibição de espécies patogênicas tem sido destacado. (CAREY, 2008; COUTINHO, 2012; FREITAS, 2011; POPPI, 2005; SUMITA, 2007; TEIXEIRA, 2011).

Em 1982, durante um surto de enterocolite hemorrágica ocorrido nos estados de Michigan e Oregon nos EUA, foi isolada a cepa de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de carne moída utilizada na fabricação de hambúrguer. Este sorotipo é considerado uma ameaça mundial à saúde pública por ser responsável por surtos de enterocolite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica, que resultaram em óbito de pacientes (PERNA et al., 2001; RILEY et al., 1983).

Carey et al. (2008) avaliaram o efeito de cepas de *Lactobacillus, Pediococcus*, *Bifidobacterium* e do pH sobre a expressão da Shiga-toxina 2 (Stx2) de *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 (ATCC 700927), isolada de amostras de carne moída crua, obtida no estado de Michigan, durante o surto de enterocolite hemorrágica ocorrido em 1982 nos EUA. Quando comparados com a cultura controle, as 14 cepas probióticas testadas apresentaram redução na expressão da toxina estudada, com destaque para *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *B. thermophilum* (ATCC 25525) e *P. pentosaceus* (FRP 243), que apresentaram maior efeito inibitório, com redução da expressão em 59,5%; 57,6% e 57,2%, respectivamente. Os autores concluíram que a inibição pode estar relacionada ao efeito do pH, como resultado da produção de ácidos orgânicos pelas bactérias probióticas.

Poppi (2005) estudou o efeito antagônico de oito cepas de *Lactobacillus*, com propriedades probióticas sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Os resultados demonstraram que as cepas avaliadas apresentaram diferentes níveis de inibição sobre as bactérias estudadas, permitindo concluir que estas cepas de *Lactobacillus* podem ser utilizadas na conservação de alimentos ou como aditivos de ração para animais.

Sumita (2007) caracterizou 40 cepas de *Lactobacillus* isoladas de fezes humanas quanto às propriedades probióticas e viabilidade celular. Destas**,** sete cepas apresentaram resultados satisfatórios, e foram avaliadas quanto ao efeito

antagônico sobre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* tendo a cepa de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 como referência. Os resultados demonstraram que as cepas selecionadas apresentaram efeito antagônico superior ao apresentado pela cepa referência, e a viabilidade celular das cepas selecionadas se mantiveram constantes durante os 29 dias de armazenamento a 4 °C.

Teixeira (2011) avaliou o efeito de uma preparação probiótica constituída de um pool de *Lactobacillus* incluindo as cepas *L. casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. acidophillus* ATCC 4356 sobre *Haemonchus contortus* em ovinos. Os resultados mostraram que no grupo tratado com a preparação probiótica, após 30 dias de tratamento, houve redução de 66,3% no número de ovos do parasito por grama de fezes (OPG) em relação ao grupo controle (sem tratamento). Em relação aos parâmetros bioquímicos, foi observado que o grupo tratado com o probiótico apresentou maiores concentrações de hemoglobina, hematócrito e ferro no sangue, além de melhores condições fisiológicas.

Com o objetivo de avaliar o efeito de micro-organismos probióticos sobre eimeriose, Freitas (2011) avaliou o desempenho antiparasitário do *pool* estudado por Teixeira (2011) sobre *Eimeria acervulina* em frangos de corte. Os resultados demonstraram redução de até 39% no número de oocistos do parasito no intestino das aves, porém não foi observada diferença estatística no desempenho zootécnico dos animais.

Coutinho (2012) avaliou o desempenho de micro-organismos probióticos sobre a sanidade e ganho de peso de bezerros desmamados. Para tanto, foi utilizada uma preparação contendo 4 espécies de *Lactobacillus* que foi aplicada em 28 animais mestiços naturalmente infectados por nematódeos. O parâmetro de resposta foi a contagem de OPG, que apresentou redução em 54% após 90 dias de tratamento, bem como diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle, sem tratamento, após 120 dias. Em relação ao ganho de peso, a preparação probiótica promoveu aumento de peso em bezerros, o que permitiu concluir que a preparação probiótica avaliada apresenta potencial como aditivo alimentar para bovinos.

Cantilho (2013) investigou a produção de substâncias que apresentam atividade inibitória contra patógenos intestinais gram-negativos, por parte de 4

cepas de *Lactobacillus.* Os resultados demonstraram que as cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram capazes de inibir o crescimento de cinco dos seis patógenos testados. O autor detectou ainda que, a ação antimicrobiana foi completamente eliminada pela neutralização do pH, o que levou a atribuir esta ação à presença dos ácidos orgânicos e à acidificação do meio.

2.3.2.1 Ação de micro-organismos probióticos no combate à mastite

No que diz respeito à mastite, alguns trabalhos tem demonstrado a eficácia de espécies de micro-organismos probióticos em inibir, *in vitro*, bactérias isoladas de mastite bovina, e revelam que os probióticos apresentam potencial para o desenvolvimento de um tratamento alternativo e eficaz no combate a patógenos causadores de mastite, tais como *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, S. dysgalactiae, S. uberis*, dentre outros (AL-QUMBER; TAGG, 2006; ANAS et al., 2008; CRISPIE et al., 2008; FROLA et al., 2012; KIM et al., 2010; SOLEIMANI et al., 2010; ESPECHE et al., 2012).

Com o objetivo de desenvolver uma forma de tratamento da mastite baseada nos diferentes mecanismos de ação dos micro-organismos probióticos, Crispie et al. (2008) avaliaram o efeito de uma suspensão de *Lactococcus lactis* DPC3147 sobre a resposta imune de vacas sadias por meio de uma infusão intramamária, e constataram que a migração de leucócitos foi favorecida pela presença da bactéria láctica. Observaram também que a avaliação do sobrenadante da referida suspensão não demonstrou a mesma eficácia, indicando que o estímulo do sistema imune está associado à presença das células probióticas no úbere do animal**.**

Espeche et al. (2012) isolaram de leite cru 117 cepas de bactérias láticas com o objetivo de avaliar seu potencial como inibidor do crescimento de patógenos causadores de mastite. Destas cepas, os autores conseguiram isolar 9 que inibiram o crescimento de *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus dysgalactiae* por meio da produção de bacteriocinas.

Da mesma forma, Al-Qumber e Tagg (2006) isolaram 33 espécies de bactérias da microbiota do úbere de vacas sadias, das quais 20 foram identificados como cocos Gram-positivos e 13 bacilos Gram-positivos, os quais

foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana sobre espécies de micro-organismos isolados de mastite bovina. Os resultados demonstraram que 9 cepas, todas do gênero *Bacillus*, apresentaram amplo espectro de inibição sobre os patógenos avaliados e potencial de utilização no tratamento da mastite.

Frola et al. (2012) estudaram, *in vitro,* a atividade antagonista das cepas de *Lactobacillus perolens* CRL1724 e *Lactobacillus plantarum* CRL1716 sobre 14 espécies de micro-organismos isolados de mastite bovina, dentre as quais *Staphylococcus* (3), *Streptococcus* (5), *Escherichia* (2), *Enterococcus* (2), *Klebsiella* e *Pseudomonas;* e o potencial de adesão destes lactobacilos em células epiteliais do canal de tetos. Os autores ainda conduziram um estudo *in vivo* para avaliar o efeito da inoculação intramamária de suspensões de *L. perolens* CRL 1724.

Os resultados do estudo *in vitro* demonstraram que a cepa de *L. perolens* CRL1724 foi capaz de inibir 12 das 14 cepas de patógenos (85,7%), e a cepa *L. plantarum* CRL1716 inibiu apenas 7 (50%). Em relação à adesão, as células de *L. perolens* CRL1724 aderiram a 75% das células epiteliais, com um índice de adesão de 14,4 células bacterianas/célula epitelial e, as células de *L. plantarum* CRL1716 aderiram a 37% das células epiteliais, com índice de adesão de 7,4 células bacterianas/célula epitelial (FROLA et al., 2012).

Nos testes realizados *in vivo*, verificou-se a concentração máxima de micro-organismo probiótico que não induziria à inflamação do quarto mamário. Desta forma, foram utilizadas 2 vacas sadias e em lactação, das quais três quartos foram inoculados respectivamente com 1 mL de suspensão contendo 10^3, 10^6 ou 10^9 UFC/mL em cada quarto, e um quarto utilizado como controle (não inoculado). Como resposta foram avaliadas a contagem de células somáticas (CSS), a aparência do leite e os sinais clínicos de mastite. Os resultados mostraram que nos quartos inoculados com as suspensões contendo 10^3 e 10^6 UFC/mL, a CCS foi duas vezes maior quando comparada com o controle, sendo este parâmetro reduzido aos níveis normais no segundo dia do teste. No quarto inoculado com a suspensão contendo 10^9 UFC/mL observou-se a presença de coágulos no leite, que desapareceram 48h após a inoculação. Em relação ao aspecto do leite, os autores concluíram que não houve modificação em sua aparência, e quanto aos sinais clínicos de mastite, os quartos inoculados e o úbere dos respectivos animais mantiveram seu aspecto normal (FROLA et al., 2012).

Posteriormente, os autores ainda realizaram um teste com 3 vacas em lactação, que tiveram 3 quartos, de cada animal, inoculados uma única vez, com a suspensão contendo 10^6 UFC/mL, e um quarto não inoculado, mantido como controle. Os resultados mostraram que todos os quartos mamários inoculados não apresentaram infecção por patógenos após 7 dias de teste. Com isso, os autores concluíram que a infusão intramamária constituída por *L. perolens* CRL1724 reúne condições para que seja desenvolvida uma formulação não-quimioterápica para o tratamento da mastite (FROLA et al., 2012).

2.3.2.2 Ação de micro-organismos probióticos sobre *S. aureus*

Espeificamente em relação ao *Staphylococcus aureus*, Anas et al. (2008) estudaram a atividade antibacteriana de oito espécies de *Lactobacillus* isoladas de leite de cabra sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados demonstraram que 3 espécies de lactobacilos foram capazes de inibir o crescimento do patógeno, e que em co-cultura, a cepa *L. plantarum* reduziu a população de *S. aureus* em 1,6 log após 24 horas, e em 100% após 72 horas.

Em 2010, Kim et al. avaliaram, *in vitro*, o efeito da bacteriocina lacticina NK34 sobre 40 cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina subclínica, sendo 20 cepas de *S. aureus* e 20 de *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN). Os resultados revelaram que a lacticina NK34 inibiu o crescimento de 70% das cepas de *S. aureus* e 90% das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Dando prosseguimento aos experimentos, os autores infectaram 100 ratos com cepas de estafilococos, dos quais 60 foram tratados com uma injeção intraperitoneal de lacticina NK34 e 40 com injeção de água destilada. As reações fisiológicas foram observadas por 7 dias. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência de 80% e 7,5% respectivamente. Além disso, em testes realizados antes e após o tratamento não houve ocorrência de efeitos adversos à lacticina NK34, permitindo aos autores concluir que a lacticina NK34 pode ser útil no controle da mastite e de infecções bacterianas sistêmicas nos animais (KIM et al., 2010).

Soleimani et al. (2010) avaliaram, *in vitro*, a atividade antagonista de 4 espécies de lactobacilos probióticos (*L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum*

ATCC 8014, *L. casei* ATCC 39392 e *L. reuteri* ATCC 23272) sobre duas cepas de *Staphylococcus aureus,* (*S. aureus* BM, isolada de mastite bovina e *S. aureus* ATCC 25923). Dentre as 4 espécies investigadas, a cepa *L. plantarum* ATCC 8014 apresentou maior atividade inibitória sobre as duas cepas de *S. aureus*, sendo considerada como uma alternativa promissora no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, sendo a primeira, *in vitro,* realizada no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP, e no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL – MG.

A segunda etapa do estudo, *in vivo*, foi desenvolvida em duas propriedades de produção de leite, o Sítio 1, no Município de Canas – SP que produz em média 50 L/dia em regime de 1 ordenha e no Sítio 2, em Lorena – SP, que produz em média 350 L/dia de leite em regime de 2 ordenhas. Os ensaios foram realizados de modo a minimizar as possíveis interferências na rotina de manejo dos animais.

3.1. Micro-organismos

3.1.1 – Cepas probióticas

No presente trabalho foram avaliadas preparações probióticas constituídas por 6 cepas de *Lactobacillus*, isoladas e na forma de "*pool*", a saber: *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 7469, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. paracasei* ST11, mantidas a 4°C em ágar MRS, composto por: peptona (10 g/L), extrato de carne (8 g/L), extrato de levedura (4 g/L), glicose (20 g/L), fosfato dipotássico (2 g/L), acetato de sódio trihidratado (5 g/L), citrato triamoniacal (2 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L), ágar (15 g/L), Polissorbato 80 (1 g/L) e água em q.s.p. 1000 mL. As cepas foram ativadas por meio de 3 repiques sucessivos em caldo MRS, a 37 °C por 24 horas.

O *pool* das referidas cepas foi obtido pela transferência de alíquotas de 1 mL da suspensão celular de cada cepa, previamente ativadas, para tubo de ensaio contendo caldo MRS para conferir uma população contendo aproximadamente 10^9 células/mL, de cada cepa.

3.1.2 – Cepas patogênicas

Foram utilizadas as cepas *Streptococcus agalactiae* cepa 1 e cepa 2, gentilmente cedidas pela Coleção de Bactérias do Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP em Botucatu - SP. Estas cepas foram mantidas em solução esterilizada de glicerol 80% a -80 °C, sendo reativadas por repiques sucessivos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) da marca Himedia a 37 °C por 24 a 48 horas.

3.2 Animais e manejo

Os ensaios *in vivo* foram realizados nas dependências dos sítios 1 e 2, que gentilmente cederam seus animais (mestiços H/Z) para este experimento, que foi realizado entre os meses de junho e agosto de 2015.

No sítio 1 os animais são ordenhados manualmente uma vez ao dia, com bezerro ao pé, sendo encaminhados ao pasto após a ordenha.

No sítio 2 os animais são ordenhados mecanicamente com bezerro ao pé duas vezes ao dia, sendo encaminhados ao pasto após as respectivas ordenhas.

3.3 Formulações probióticas

3.3.1 - Formulação A

Esta formulação foi desenvolvida por Santos (2015) considerando os veículos empregados nas formulações antibióticas para o tratamento da mastite disponíveis no mercado. Para tanto, considerou-se as normas constantes na legislação vigente, bem como com as Boas Práticas de Produção de Produtos Veterinários preconizadas nas Instruções Normativas do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (IN - MAPA N° 13, de 03.10.03; IN - SDA N° 25, de 20.08.08; IN - MAPA nº 26, de 9.07.09), cuja composição se encontra apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da emulsão base para o desenvolvimento da Formulação A

Componentes	Concentração(g)	(% m/m)
Monoestearato de glicerila	180,0	10,00
Lanolina anidra	54,0	3,00
Óleo mineral	90,0	5,00
Monoestearato de sorbitano (Spam 80®)	71,6	3,98
Polissorbato 80 (Tween 80®)	36,4	2,02
Frutoligossacarídeo (FOS)	40,0	2,00
Água destilada	qsp 1800,0	74,00

Para o preparo da emulsão foram pesados, em um frasco Erlenmeyer de 1000 mL, os constituintes da fase oleosa constituídos de monoesterato de glicerila, lanolina anidra, óleo mineral e Spam 80®, utilizando-se uma Balança da marca Digimed, mod. KN8000DR, com precisão de 0,01g.

Da mesma maneira, em outro frasco Erlenmeyer de 2000 mL foram pesados os componentes da fase aquosa constituídos de Tween 80® frutoligossacarídeo e água destilada. Ambos os frascos foram submetidos a esterilização em autoclave a 121 ºC por 15 minutos, sendo que o volume da fase aquosa evaporado durante este processo foi reposto com água destilada esterilizada.

Posteriormente, as duas fases foram deixadas em repouso até resfriarem a aproximadamente 75 ºC, após o que, dentro de uma capela de fluxo laminar, estas soluções foram vertidas em um béquer com capacidade para 4000 mL previamente esterilizado. A mistura foi agitada de forma vigorosa, com auxílio de um agitador do tipo *mixer*, devidamente esterilizado, até a formação de emulsão viscosa e estável. Em seguida, a emulsão foi submetida a agitação lenta e manual com auxílio de uma espátula plástica, até atingir a temperatura ambiente. O pH

final da formulação foi ajustado em 5,50 utilizando solução de ácido cítrico 20% ou hidróxido de sódio 1%.

Posteriormente, alíquotas das suspensões de células de *Lactobacillus,* devidamente ativadas, e o *pool* das referidas cepas foram incorporadas à esta emulsão, para conferir aproximadamente 10^8 células/g, sendo acondicionadas em seringas plásticas descartáveis adequadas para a injeção intramamária contendo 10g e armazenadas a 4 °C.

3.3.2 Formulação B

Esta formulação foi preparada tendo como veículo os componentes de uma preparação antibiótica comercial para tratamento de mastite, sem o princípio ativo, mantida sob refrigeração a 4 °C.

Desta maneira, esta formulação foi preparada tendo como base 7 g do referido veículo adicionado de 1 mL de uma suspensão celular contendo o *pool* de *Lactobacillus*, contendo aproximadamente de 10^9 células/mL, sendo posteriormente acondicionada em seringas plásticas descartáveis adequadas para a injeção intramamária e armazenadas a 4°C.

3.4. Delineamento experimental para avaliação *in vitro* do efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos.

A avaliação do efeito de inibição das cepas de *Lactobacillus*, de forma isolada ou na forma de "*pool*", sobre os patógenos foi realizada em conformidade com o planejamento experimental apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. **Planejamento experimental para avaliação do efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos**

	Lactobacillus						Patógeno
Exp.	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	-	-	-	+
2	-	+	-	-	-	-	+
3	-	-	+	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	-	+
5	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+

A: *L. plantarum* ATCC 8014; B: *L. acidophilus* ATCC 4356; C: *L. delbrueckii* UFV H2b20; D: *L. fermentum* ATCC 9338; E: *L. casei* ATCC 7469; F: *L. paracasei* ST11; G(1) *S. agalactiae* Cepa 1 ou G(2) *S. agalactiae* Cepa 2;

3.4.1 Avaliação do efeito de inibição pela técnica de difusão em ágar.

3.4.1.1 Técnica de dupla camada

Esta avaliação foi realizada por meio do método de dupla camada (difusão em ágar) descrito por Karska-Wysocki et al. (2010) modificado.

O procedimento consistiu em inocular, no centro de uma placa de Petri contendo Ágar MRS, 10 μL de uma suspensão de células das respectivas cepas de *Lactobacillus,* previamente ativadas, contendo aproximadamente 10^{10} UFC/mL, seguido de incubação a 37 °C por 48 - 72 horas, até o surgimento de uma massa celular denominada de *spot*.

Em seguida uma alíquota de 1 mL de uma suspensão, contendo células das cepas patogênicas (10^8 cel/mL), foi adicionada a 9 mL de meio (BHI e MRS na proporção 1:1) a 47 °C, homogeneizada e inoculadas sobre o *spot* de *Lactobacillus*.

Após resfriamento e solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 - 72 horas, após o que determinou-se o raio do halo de inibição formado ao

redor do *spot.* O resultado foi considerado positivo quando o raio do referido halo de inibição foi superior a 1 mm.

3.4.1.2 Técnica de poço

Como procedimento alternativo avaliou-se o método de difusão por meio da técnica de poço, modificado de Nathan et al. (1978). Para tanto, no centro da placa contendo Ágar MRS perfurou-se um poço de 4 mm de diâmetro que foi preenchido com 50 μL da referida suspensão de células das cepas probióticas, evitando assim o espalhamento do *spot*, seguido do procedimento descrito no item anterior.

3.4.1.3 Técnica de poço selado

De acordo com o método descrito por Siddique; Loken; Hoyt (1965), a fim de evitar o surgimento de fissuras, o que provoca a formação de um halo de inibição com formato irregular, uma gota de ágar MRS liquefeito foi colocada no fundo do poço para selá-lo, de modo que não houvesse ponto de fragilidade na camada de ágar, e este se mantivesse íntegro durante as 72 horas de incubação a 37 °C.

Posteriormente, este poço foi preenchido com 50 μL de suspensão de *Lactobacillus*, contendo aproximadamente 10^{10} UFC/mL, deixado em repouso até que a suspensão de células fosse absorvida pela camada de ágar, e o poço preenchido com ágar MRS a aproximadamente 47 °C, fazendo com que a camada de ágar recuperasse sua integridade. Em seguida uma alíquota de 1 mL de uma suspensão, contendo células das cepas patogênicas (10^8 cel/mL), foi adicionada a 9 mL de meio (BHI e MRS na proporção 1:1) a 47 °C, homogeneizada e inoculadas sobre o *spot* de *Lactobacillus*.

Após resfriamento e solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 - 72 horas, após o que determinou-se o raio do halo de inibição formado ao redor do *spot.* O resultado foi considerado positivo quando o raio do referido halo de inibição foi superior a 1 mm.

3.4.1.4 Método do disco de difusão

Este método é uma modificação no método preconizado por Bauer et al. (1966) no qual empregou-se um disco de papel de filtro (Whatman nº 42) esterilizado, de aproximadamente 7 mm de diâmetro, que foi embebido na suspensão de células de *Lactobacillus* previamente ativadas e disposto no centro da placa contendo Ágar MRS. Esta placa foi incubada a 37 °C por 24 a 48 h, até se observar a formação do *spot*. Em seguida, adicionou-se uma camada de ágar MRS + BHI (1:1) contendo 10^7 cel/mL das respectivas cepas patogênicas, seguido de incubação a 37 °C, por 24 a 48 h, sendo então observada a formação do halo de inibição.

Como procedimento alternativo, avaliou-se o efeito da selagem do disco de papel de filtro contendo *Lactobacillus* pela adição de uma gota de ágar MRS liquefeito sobre este. Com isto, as células probióticas foram mantidas imobilizadas na região central da placa, sem serem arrastadas no momento da adição da segunda camada de ágar (BHI e MRS, na proporção de 1:1), evitando assim o crescimento desordenado destes micro-organismos. As placas foram devidamente incubadas a 37 °C por 24 a 48h, após o que se acrescentou uma camada de ágar BHI + MRS (1:1) contendo 10^7 cel/mL das respectivas células patogênicas, seguido de incubação a 37 °C, por 24 a 48 h, sendo então observada a formação do halo de inibição.

3.4.2 Avaliação do efeito de inibição pela técnica de co-cultura.

A co-cultura foi realizada por meio da mistura de 500 μL de uma suspensão do *pool* de células das respectivas cepas de *Lactobacillus,* previamente ativadas em caldo MRS e contendo aproximadamente 10^9 células/mL com 500 μL da suspensão de células de cada cepa patogênica, previamente ativada em caldo BHI, contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL. Como controle cultivou-se as respectivas cepas patogênicas isoladas, na ausência de células *de Lactobacillus.*

Esta mistura foi incubada por 72 horas em estufa a 37 °C, sendo coletadas amostras nos tempos inicial; 24; 48 e 72 horas, para determinação da população de células viáveis das cepas patogênicas por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

O índice de inibição foi calculado de acordo com a equação 1:

$$\%\ \text{inibição} = \left(1 - \frac{\mathrm{N_{Co-cultura}}}{\mathrm{N_{Controle}}}\right) \times\ 100 \quad (1)$$

na qual,

$N_{co\text{-}cultura}$ = Número de células viáveis das cepas patogênicas cultivadas em co-cultura.

$N_{controle}$ = Número de células viáveis das cepas patogênicas cultivadas individualmente.

3.5. Avaliação da inocuidade das preparações probióticas

Antes da avaliação da eficácia das preparações probióticas quanto ao poder de cura da mastite, as referidas formulações foram testadas no tocante à sua inocuidade em relação à saúde dos animais. Para tanto, 3 grupos constituídos de vacas, foram submetidos a administração intramamária de dose única das formulações A ou B contendo aproximadamente 10^9 ou 10^6 células de *Lactobacillus*. Antes da inoculação dos animais com as referidas preparações o estado de saúde dos animais, bem como a qualidade do leite foram avaliadas, considerando a condutividade elétrica do leite (CEL), CMT, contagem de células somáticas (CCS), aspecto e avaliação microbiológica.

As formulações A e B foram avaliadas nos animais pertencentes ao sítio 1, em conformidade com o seguinte delineamento:

Grupo A: composto por 7 animais em regime de 1 ordenha/dia, que foram inoculados com dose única, após a ordenha, com 10 g das respectivas preparações probióticas contendo aproximadamente 10^9 células/dose. Para tanto, inoculou-se uma dose em 3 quartos mamários de cada animal, sendo o quarto dianteiro esquerdo (DE) mantido como controle, sem inoculação, conforme especificado abaixo. Os animais foram mantidos isolados dos bezerros e

monitorados antes da ordenha seguinte quanto ao seu estado de saúde, bem como a qualidade do leite por 3 dias consecutivos.

Animal 1: inoculado com a preparação contendo *L. acidophilus* ATCC 4356;
Animal 2: inoculado com a preparação contendo *L. casei* ATCC 7469;
Animal 3: inoculado com a preparação contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20;
Animal 4: inoculado com a preparação contendo *L. fermentum* ATCC 9338;
Animal 5: inoculado com a preparação contendo *L. plantarum* ATCC 8014;
Animal 6: inoculado com a preparação contendo *L. paracasei* ST11;
Animal 7: inoculado com a preparação contendo o *pool* de *Lactobacillus*

Grupo B1: composto por 5 animais em regime de 1 ordenha/dia, foram inoculados com dose única após a ordenha, com 8 g da preparação composta pelo veículo comercial e o *pool* de *Lactobacillus* contendo aproximadamente 10^9 células/dose. Para tanto, inoculou-se uma dose nos 2 quartos traseiros de cada animal, sendo os quartos dianteiros mantidos como controle, sem inoculação. Os animais foram mantidos isolados dos bezerros e monitorados antes da ordenha seguinte quanto ao seu estado de saúde, bem como a qualidade do leite por 3 dias consecutivos.

A formulação B foi também avaliada nos animais pertencentes ao sítio 2 em conformidade com o seguinte delineamento

Grupo B2: composto por 5 animais em regime de 2 ordenhas/dia, os quais foram inoculados com 8 g da preparação probiótica formulada com o veículo comercial contendo o *pool* de *Lactobacillus* com aproximadamente 10^6 células/dose, durante 3 dias consecutivos. Assim, inoculou-se, após a segunda ordenha, os tetos traseiros sendo mantidos como controle os tetos dianteiros de cada animal, sem inoculação. Os animais foram mantidos isolados dos bezerros e monitorados antes da primeira ordenha quanto ao seu estado de saúde, bem como a qualidade do leite nos tempos inicial; 1; 2; 3; 4; 5 e 9 dias.

3.6 Métodos Analíticos

3.6.1 – Determinação da população de *Lactobacillus*

A população de células das suspensões de *Lactobacillus* foi determinada pela técnica de contagem em câmara de Neubauer e confirmada pelo plaqueamento em ágar MRS, pelo técnica de *pour plate*, sendo as respectivas diluições realizadas em solução salina (NaCl 0,9 % m/v) devidamente esterilizada.

3.6.2 – Determinação da população de células patogênicas

A determinação da população de células destas cepas foi realizada por método comparativo utilizando escala de MacFarland e confirmada por contagem em placa (*spread plate)* em ágar BHI, sendo as respectivas diluições realizadas em solução salina (0,9 % NaCl) devidamente esterilizada.

3.6.3 - Medida do halo de inibição

Para mensurar o halo de inibição do probiótico sobre o patógeno foi utilizado um paquímetro digital marca Jomarca, modelo 205509, com resolução de 0,01 mm, sendo medido o raio da coroa circular relativa ao halo de inibição, que corresponde à distância entre as bordas do *spot* e do halo.

3.6.4 - Quantificação por qPCR.

A avaliação do crescimento do patógeno foi realizada por técnica de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) utilizando equipamento de PCR Real Time modelo ABI Step One (Applied Biosystems) do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Alfenas – MG.

As amostras dos ensaios de co-cultura de *Lactobacillus* contra *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* foram processadas conforme protocolo básico do kit de extração de RNA Ambion® PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies), que utiliza colunas de afinidade, a saber:

1) Preparar a solução de lise contendo 1% de 2-mercaptoetanol. Adicionar 10 µL de 2-mercaptoetanol para cada 1 mL de tampão de lise.
2) Adicionar 700 µL de solução de lise com 2-mercaptoetanol em cada tubo
3) Levar ao vortex até a completa ruptura das células.
4) Homogeneizar e centrifugar a 12.000 × *g* por 2 min.
5) Adicionar 700 µL de etanol 70% em cada tubo, misturar bem
6) Transferir 700 µL da amostra para a coluna.
7) Centrifugar a 12.000 × *g* por 15 segundos à temperatura ambiente. Descartar o líquido e recolocar o tubo coletor.
8) Repetir até passar todo o líquido pela coluna
9) Adicionar 700 µL de tampão de lavagem I (*Wash Buffer I*) à coluna. Centrifugar por 15 s à temperatura ambiente. Descartar o tubo coletor e colocar um novo.
10) Adicionar 500 µL de tampão de lavagem II (*Wash Buffer II*) à coluna. Centrifugar por 15 s à temperatura ambiente. Descartar o líquido e repetir este passo uma vez.
11) Após retirar o líquido, centrifugar a coluna a 12.000 × *g* por 2 min para secar a membrana.
12) Descartar o tubo coletor e colocar o tubo de recuperação (*recovery tube*).
13) Adicionar 30 µL de água livre de RNAse no centro da coluna.
14) Incubar à temperatura ambiente por 1 min.

15) Centrifugar a 12.000 × *g* por 2 min em temperatura ambiente para eluir o RNA da membrana e congelar imediatamente, ou proceder a síntese de cDNA, mantendo no gelo.

Ciclo de amplificação para obtenção do cDNA

As amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA, de acordo com o seguinte protocolo.

A 11µl do RNA foi adicionada 1µL de uma mistura contendo os quatro "dntp´s", 1µl de "*random primers*". A seguir, as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C. Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos. Ao final deste tempo foram adicionados às misturas, 2µl DTT e o 4µL de tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3; KCl, 375mM; $MgCl_2$ 15mM) e colocado novamente no termociclador por 20 segundos a 37°C. Após os 20 segundos, adiciona-se 1 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), que é a responsável pela complementação do RNA para cDNA, que é de fita dupla. O grau de pureza das amostras foi analisado no Nanodrop ND1000 pela da medida da absorbância 260/280. Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR, estas foram congeladas a -20° C para o posterior uso em PCR quantitativo em tempo real.

Protocolo da reação de PCR quantitativo em tempo real

As reações da PCR em tempo real foram realizadas em equipamento ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 10µL por reação. O volume de 1µL de DNA ou cDNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 5 µL de 2X Power SYBR® Green Master Mix e 1µL de uma mistura que inclui os marcadores *forward* e o *reverse*,

com as sequências (5' – 3') específicas para *S. agalactiae* (F: CCCTGAACATTATCTTTGATATTTCTCA e R:TTCACCAGCTGTATTAGAAGTACATGC) na concentração de 10µM e 3µL de água ultra pura. Foram adicionados às reações dois controles negativos e um controle positivo. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 95 °C por 10 minutos, seguido de quarenta ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por um minuto. Na próxima etapa foram realizados o estagio de *Melt Curve*, constituído de um estágio inicial a 95°C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, seguido da elevação da temperatura, realizando a leitura após cada incremento de 0,3 °C, até atingir a temperatura final de 95 °C.

3.6.5 Avaliação dos parâmetros fisiológicos dos animais e qualidade do leite

Os animais submetidos às referidas avaliações foram devidamente monitorados no tocante aos sinais clínicos de inflamação no úbere e sistêmica, sendo medidas as temperaturas dos 4 quartos mamários individualmente, utilizando um termômetro clínico veterinário de infravermelho – tipo pistola, marca Dofu Vet, modelo DT-8806C, bem como a observação da presença de hiperemia, inchaço e dor.

Antes das respectivas ordenhas os 3 primeiros jatos de cada quarto mamário foram desprezados e amostras do leite foram coletadas para determinação da resistência elétrica (CEL) em detector de mastite da marca Dramiński, modelo Mastitis Detector 4x4Q, de acordo com as instruções do fabricante, que consistem em colocar aproximadamente 15 mL de leite no recipiente acoplado ao aparelho e realizar a leitura. De acordo com o manual do aparelho, o teto cujo leite apresenta valores de resistência elétrica superiores a 300 unidades (condutividade inferior a 7,3 mS/cm) pode ser considerado saudável. Entre 300 e 250 unidades (condutividade entre 7,3 e 8,8 mS/cm) o quarto mamário apresenta quadro de mastite subclínica, e abaixo de 250 unidades (condutividade superior a 8,8 mS/cm), caracteriza-se mastite subclínica com rápido progresso para a sua forma clínica.

De acordo com o fabricante, 220 unidades apresentadas pelo aparelho, se equivalem 100 Ω/cm. A condutividade elétrica corresponde ao inverso do valor da

resistência elétrica, sendo assim, as leituras obtidas no presente trabalho foram convertidas em mS/cm, de acordo com a equação 2:

$$CEL = \frac{2200}{UD} \qquad (2)$$

na qual:

CEL = Condutividade Elétrica do Leite (mS/cm)

UD = Unidades Dramiński

Avaliou-se também o aspecto do leite, por meio da observação de sua coloração e a possível presença de grumos, bem como o índice do *California Mastitis Test* (CMT), de acordo com o método proposto por Schalm; Noorlander (1957).

Em seguida, após assepsia dos tetos com solução de iodo, amostras de leite foram coletadas em frascos devidamente esterilizados para avaliação microbiológica utilizando os meio ágar Sangue, formulado com meio BHI (37 g/L), ágar (15 g/L) e sangue desfibrinado de carneiro da marca Ebefarma (50 g/L); e ágar MacConkey.

Amostras do leite foram coletadas em frascos apropriados e enviadas à Clínica do Leite, na ESALQ-USP em Piracicaba – SP, para determinação da Contagem de Células Somáticas (CCS).

3.7 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados por Teste "*t de Student*", utilizando-se o programa Excel for Mac 2011, da empresa Microsoft®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação *in vitro* do efeito de inibição das cepas patogênicas por *Lactobacillus*.

4.1.1 Difusão em ágar.

Inicialmente, foi proposto o estudo do efeito de inibição por meio de técnica de difusão em ágar, sendo o primeiro método, de dupla camada, preconizado por Karska-Wysocki et al. (2010). No entanto, este não rendeu resultados satisfatórios porque em todas as placas a suspensão de *Lactobacillus* apresentou um espalhamento irregular, o que favoreceu o surgimento de *spots* com tamanhos e formatos variados e ainda, no momento da adição do ágar contendo o patógeno, parte das células de *Lactobacillus* do *spot* se mesclou ao ágar ainda liquefeito. Com isso, observou-se o desenvolvimento das espécies probióticas nesta segunda camada, impossibilitando a formação do halo de inibição.

Por este motivo, com o objetivo de adequar a técnica e favorecer a obtenção de resultados confiáveis, foi proposto um ajuste no método de dupla camada que consistiu na utilização da técnica de poço, para a contenção das células de *Lactobacillus*. Os resultados foram insatisfatórios porque, durante a incubação em estufa houve o surgimento de fissuras de caráter radial no ágar, que foram colonizadas pela espécie probiótica, dificultando a medição das zonas de inibição. Este problema também foi relatado por Bell e Grundy (1968) que, com isso, recomendaram que o poço fosse selado para manter a integridade do gel, o que também foi testado apresentando os mesmos problemas.

Posteriormente, o método que utilizou o disco de papel embebido em suspensão de células de *Lactobacillus* rendeu resultados satisfatórios, favorecendo o crescimento do *spot* com formato regular. No entanto, ao aplicar a 2ª camada, contendo as cepas patogênicas, a movimentação do meio ainda liquefeito arrastou uma parte das células do *Lactobacillus* presentes no *spot*, sendo observado um crescimento indesejado do probiótico na segunda camada, impossibilitando a formação de uma zona nítida de inibição.

Desta forma foi testado o método em que o disco de papel embebido com suspensão de *Lactobacillus* foi selado com ágar MRS. Inicialmente, este método se mostrou adequado, com crescimento do *Lactobacillus* em *spots* com formato

regular, bem como nítidas zonas de inibição. No entanto, o método não apresentou reprodutibilidade, sendo assim desconsiderado.

Uma possível causa dos problemas enfrentados na execução destas técnicas se deve provavelmente à desidratação do meio, acarretando no surgimento de fissuras conforme descritas nos resultados da técnica de poço.

De acordo com Bonev; Hooper; Parisot (2009) uma desvantagem de se avaliar o efeito de inibição de patógenos por meio de métodos de difusão em ágar reside justamente em assumir que os respectivos compostos que apresentam efeito antimicrobiano se difundem livremente pelo ágar, além das possíveis interações hidrofóbicas ou anfipáticas observadas entre o ágar e estes compostos, bem como a degradação destes compostos. Outra desvantagem destes métodos reside na existência de células enfraquecidas e estressadas sendo necessário condições específicas de cultivo, bem como o fato destes métodos não detectarem células não cultiváveis, o que representa um risco de resultados falso negativos das análises de quantificação de micro-organismos (JUSTÉ et al., 2008). Esta observação corrobora a confiabilidade e a qualidade dos resultados obtidos por qPCR na quantificação de micro-organismos e destacam a sensibilidade e a especificidade deste método em relação aos métodos de quantificação em placa (BOYER; COMBRISSON, 2013).

4.1.2 Co-cultura.

Diferentemente dos métodos de difusão em ágar avaliados, o método de co-cultura aliado à quantificação de células viáveis do patógeno por meio da qPCR possibilitou avaliar o efeito de inibição do crescimento das cepas de *Streptococcus agalactiae* (cepas 1 e 2) pelas respectivas cepas de *Lactobacillus* após 24; 48 e 72 horas, conforme demonstrado na Tabela 3.

Observa-se que a cepa *S. agalactiae* 1, nas primeiras 48 horas, teve seu crescimento inibido por apenas 2 das 6 cepas de lactobacilos avaliadas, *L. acidophilus* e *L. fermentum*. Verifica-se ainda que esta cepa patogênica sofreu inibição em níveis de 99,79% e 96,73%, respectivamente após 24 horas, em regime de co-cultura.

Tabela 3. Efeito de inibição (%) do crescimento exercido pelas cepas de *Lactobacillus* sobre *Streptococcus agalactiae*

		Cepas de *Lactobacillus*					
Tempo (h)	**Cepa Patógeno**	***L. acidophilus***	***L. casei***	***L. delbrueckii***	***L. fermentum***	***L. plantarum***	***L. paracasei***
24	1	99,79	0,00	0,00	96,73	0,00	0,00
	2	86,67	0,00	79,52	0,00	0,00	0,00
48	1	98,85	0,00	0,00	98,96	0,00	0,00
	2	98,39	93,16	99,38	98,67	95,86	97,59
72	1	91,47	74,95	94,02	97,69	99,91	93,55
	2	96,72	96,51	93,24	98,54	97,36	98,70

Destaca-se que nas primeiras 24 horas, o *S. agalactiae* cepa 1 cultivado isoladamente (controle) apresentou incremento na concentração celular em aproximadamente 2,7 log, enquanto em co-cultura com a cepa *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentou redução no crescimento de 0,5 log, correspondendo a um nível de inibição de 99,79%.

Após 48 horas, a cepa *S. agalactiae* cepa 1 manteve o mesmo comportamento de crescimento, sendo inibida apenas pelas cepas de *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. fermentum* ATCC 9338 , em níveis de 98,85% e 98,96%, respectivamente. Nota-se que após 72 horas de co-cultivo, todas as cepas probióticas avaliadas apresentaram efeito de inibição sobre o *S. agalactiae* cepa 1, em níveis superiores a 74,95%, com destaque para *L. plantarum* ATCC 8014, que apresentou o maior índice de inibição, correspondendo a 99,91%.

No tocante ao *S. agalactiae* cepa 2, observa-se que nas primeiras 24 horas apenas 2 cepas de *Lactobacillus* inibiram seu crescimento, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. delbrueckii* UFV H2B20 em níveis de 86,7% e 79,5%, respectivamente.

No entanto, após 48 horas, a cepa *S. agalactiae* 2 apresentou maior susceptibilidade à presença das cepas de *Lactobacillus* quando comparada com cepa 1, uma vez que as cepas probióticas avaliadas inibiram seu crescimento em níveis superiores a 93%, com destaque para *L. delbrueckii* UFV H2B20, com 99,38%. Verifica-se ainda que, ao final das 72 horas do ensaio as cepas probióticas avaliadas foram capazes de inibir o *S. agalactiae* cepa 2 em níveis

superiores a 93,2%, com ênfase para 98,7% de inibição pela cepa *L. paracasei* ST11

Observa-se ainda que nas primeiras 24 horas de co-cultivo, a cepa *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentou efeito de inibição sobre as duas cepas patogênicas estudadas (1 e 2), correspondendo a 99,79% e 86,67% de inibição, respectivamente. Por outro lado, a cepa *L. delbrueckii* UFV H2B20 inibiu apenas a cepa 2 em nível de 79,52%, assim como *L. fermentum* ATCC 8014 inibiu a cepa 1 em nível de 96,73%. Estes resultados podem ser considerados promissores para a terapêutica de controle da mastite, uma vez que o uso de formulações que contenham estas cepas probióticas, na forma individual ou associada, apresentam potencial para reduzir a carga bacteriana do patógeno nas primeiras 24 horas após sua administração.

Estes resultados demonstram que, ao final de 72 horas, as cepas de *Lactobacillus* testadas produziram metabólitos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e possivelmente bacteriocinas, que exercem efeito de inibição sobre o crescimento das cepas de *S. agalactiae* avaliadas, cujos níveis de inibição variaram entre 79,5% a 99,9%.

Na literatura consultada foi identificado um número limitado de estudos que empregam a técnica de qPCR para avaliar o potencial inibitório de cepas de bactérias láticas sobre patógenos causadores de mastite, sendo que a maioria dos trabalhos reporta a utilização de técnicas envolvendo o cultivo em placa (KARSKA-WYSOCKI et al., 2010; FROLA et al., 2012; SOLEIMANI et al., 2010; NADER-MACÍAS et al., 2008)

O emprego da técnica de qPCR apresenta vantagens sobre os métodos de plaqueamento, uma vez que a contagem de Unidades Formadoras de Colônias, apesar de ser considerado o “padrão ouro” (CHAMPAGNE et al., 2011) dos métodos de quantificação, pode apresentar erros, principalmente pelo fato de uma colônia poder ter origem em mais de uma célula, ou ainda, existir células que estejam viáveis, mas não cultiváveis (POSTOLLEC et al., 2011; MARTINEZ et al., 2015)

Martinez et al. (2015) avaliaram o efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus sakei* sobre 2 cepas de *Listeria monocytogenes* empregando a técnica de qPCR. Foi observado que, a contagem de células viáveis de patógenos feita por qPCR após os ensaios em co-cultura resultou em níveis mais elevados de células

quando comparado com a contagem em placa. Os autores observaram diferença na sensibilidade dos dois métodos. Os resultados obtidos por plaqueamento sugeriram redução de aproximadamente 3 log UFC/g na concentração do patógeno, em 28 dias. No entanto, quando o mesmo teste foi avaliado por qPCR os valores de concentração celular encontrados revelaram redução de apenas 0,4 log de cópias/g. Os autores sugeriram que esta diferença foi causada porque as técnicas de plaqueamento apresenta limitações e apenas detecta a fração cultivável das bactérias, enquanto a técnica de qPCR amplifica o material genético de todas as células presentes, o que pode não ser apropriado para a avaliação da inibição do crescimento de patógenos.

No presente trabalho, este problema foi eliminado, uma vez que a quantificação de células do patógeno no ensaio *in vitro* foi realizada por meio da extração do RNA do patógeno. Reimão et al. (2011) ressaltam que este material é mais apropriado para a avaliação de organismos vivos, por se degradar mais rapidamente que o DNA no caso de morte celular.

Karska-Wysocki et al. (2010) testaram o método de co-cultura entre cepas de *Lactobacillus* e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Os autores observaram inibição de parte das células do patógeno em aproximadamente 5 $\log_{10}$ UFC/mL em 24 horas de cultivo, verificando uma inibição total das cepas patogênicas após 48 horas, o que foi atribuído à presença de compostos antimicrobianos secretados pelos probióticos. No entanto, os autores utilizaram o método de espalhamento em placa contendo meio específico para MRSA, que é menos sensível que qPCR.

Frola et al. (2012) avaliaram o efeito de inibição de 2 cepas probióticas sobre 14 cepas de espécies patogênicas causadoras de mastite em bovinos e constataram que, a cepa de *Lactobacillus perolens* CRL1724 inibiu 12 das 14 cepas patogênicas estudadas e a cepa *L. plantarum* CRL 1716 apresentou inibição sobre 7 cepas. No entanto, o método utilizado para a detecção do efeito de inibição considera apenas a largura da zona de inibição e a classifica como alta, intermediária, baixa ou ausente, sem apresentar dados quantitativos do número de células. Os autores sugeriram que a ação inibitória de espécies probióticas sobre espécies patogênicas testadas pode estar associada à co-agregação entre as espécies, o que promove o contato entre as células e submete o patógeno à ação de ácidos orgânicos, bacteriocinas e peróxidos

produzidos pelo probiótico, o que pode ter ocorrido entre as células testadas no presente trabalho.

O estudo conduzido por Bendali, Madi e Sadoun (2011) indicou que uma cepa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* foi capaz de reduzir em 2 log o número de células de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) quando cultivada em regime de co-cultura, sendo que o efeito de inibição foi atribuído a uma substância presente no sobrenadante, e que apresentou atividade antimicrobiana mesmo após tratamento com catalase, neutralização de pH e aquecimento a 100 °C por 5 min, tendo sido desativada apenas com enzimas proteolíticas, sugerindo a existência de uma bacteriocina**.** Nos ensaios, *in vivo,* realizados em coelhos por meio da administração oral de leite contendo 10^7 UFC/mL de *S. aureus*, a diarreia causada pelo patógeno e a destruição da mucosa intestinal dos animais observada pelos autores foi completamente revertida após a administração de leite contendo a cepa probiótica.

4.3. Avaliação da inocuidade das formulações probióticas

4.3.1 Formulação A

Após estudos farmacotécnicos para a preparação de uma emulsão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi desenvolvida a Formulação A, como parte da dissertação de mestrado do estudante Victor Daniel de Salles Santos (SANTOS, 2015). A partir desta formulação base foram preparadas 7 preparações contendo individualmente as 6 cepas de *Lactobacillus* e o respectivo *pool.*

As formulações foram avaliadas em 7 animais, conforme descrito no item 3.5, sendo que cada animal (3 tetos + 1 controle) foi tratado com uma preparação contendo uma cepa de *Lactobacillus* específica (6 animais) e uma contendo um *pool* das referidas cepas. Os resultados relativos à condutividade elétrica do leite, temperatura dos tetos, bem como sinais de alteração na saúde dos animais encontram-se apresentados nas Tabelas 4 a 10.

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A1 (*L. acidophilus* ATCC 4356)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	6,67	6,67	6,67	35,0	34,9	35,4	-	-	-	-	-	-
DD	7,10	10,48	11,00	35,0	35,6	35,6	-	-	-	-	-	-
TE	6,11	9,57	10,48	35,0	35,4	35,8	-	-	-	-	-	-
TD	6,29	10,48	12,22	35,0	36,1	35,0	-	-	-	-	1	1
Média[z]	6,50	10,17	11,23	35,0	35,7	35,5						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)
** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)
[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)
z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas
Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

No tocante a Formulação A1 (Tabela 4), observa-se que houve um incremento médio no valor da condutividade elétrica do leite (CEL) dos tetos tratados correspondente a 51,42% em relação ao valor do teto controle e de 56,46% em comparação ao valor médio obtido no tempo inicial. Verifica-se ainda que após 48 horas, a média dos valores de condutividade elétrica do leite dos tetos tratados foi 68,37% maior em relação ao valor do teto controle, com destaque para o teto traseiro direito (TD), que ao final das 48h, apresentou 94,27% de aumento em relação ao tempo inicial.

Em relação à temperatura dos quartos mamários, observou-se variação entre 35,0 ºC e 36,1 ºC. Resultados semelhantes foram observados por Metzner et al. (2014), que utilizaram um termômetro de infravermelho para monitorar a temperatura da superfície dos úberes de vacas de leite tratados com uma suspensão de *Escherichia coli*, sendo observado uma variação na temperatura entre 34,1 ºC e 37,9 ºC.

Ressalta-se que o animal 1 tratado com a formulação A1 apresentou sinais de desconforto no teto traseiro direito no momento da ordenha nos tempos 24 e 48 horas (Tabela 4), o que sinaliza a presença de inflamação aguda no local. Os

demais tetos tratados apresentaram aspecto normais, sem presença de inchaço ou manifestação de desconforto.

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A2 (*L. casei* ATCC 7469)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	6,29	6,88	6,47	35,0	34,8	35,3	-	-	-	-	-	-
DD	5,79	11,58	11,00	35,0	36,1	35,0	-	-	-	-	-	-
TE	5,50	11,00	11,00	35,6	35,3	36,2	-	-	-	-	-	-
TD	6,11	11,58	11,00	35,0	36,1	35,0	-	-	-	-	-	-
Média[z]	5,80	11,39	11,00	35,2	35,8	35,4						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)
** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)
[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)
z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas
Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

Os resultados apresentados na Tabela 5, relativos a avaliação da formulação A2, permitem observar que após 24 horas de tratamento, os tetos tratados com a referida formulação apresentaram média de condutividade elétrica do leite (11,39 mS/cm) 65,56% superior ao resultado observado no teto controle (6,88 mS/cm), e de 96,38% em relação às médias obtidas no tempo inicial (5,80 para 11,00 mS/cm)**.** Após 48 horas observou-se que os valores de CEL foram pouco alterados em relação aos observados em 24h

Quanto aos sinais de inflamação, não foram observadas alterações que evidenciassem a presença de hiperemia, inchaço ou dor.

Os tetos tratados com a formulação A2 apresentaram variação na temperatura entre 35,0 ºC e 36,2 ºC (Tabela 5), o que indica que o animal não apresentou febre. Os resultados de CEL permitem inferir que os tetos tratados passaram de um quadro normal para um quadro de mastite subclínica podendo evoluir para mastite clínica.

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A3 (*L. delbrueckii* UFV H2B20)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	5,79	6,29	6,47	35,0	35,0	35,1	-	-	-	-	-	-
DD	5,12	10,48	11,58	35,0	34,9	35,0	-	-	-	-	1	1 ; 3
TE	5,00	9,57	10,48	35,1	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
TD	5,64	9,57	10,00	35,2	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
Média[z]	5,25	9,87	10,69	35,1	35,0	35,0						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)
** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)
[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)
z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas
Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

Os resultados obtidos no teste de inocuidade da formulação A3 (Tabela 6), após 24 horas, permitem verificar que houve incremento dos valores médios de CEL em relação ao teto controle em aproximadamente 56,92%. Em relação aos valores obtidos no tempo inicial, a condutividade foi aumentada em 88,00%. Após 48 horas foram identificados valores 65,22% superiores em relação ao controle (6,47 para 10,69 mS/cm) e 103,62% superiores em comparação ao valor médio dos tetos tratados, em relação ao tempo inicial (5,25 para 10,69 mS/cm).

Verifica-se que a média das temperaturas dos quartos mamários permaneceu em torno de 35,0°C durante o tratamento, o que demonstra que esta formulação não induziu febre. No entanto, o animal manifestou dor no teto traseiro direito no momento da ordenha nos tempos 24 e 48 horas, bem como inchaço no mesmo quarto mamário 48 horas após a aplicação, o que sugere a instalação de uma mastite clínica após a inoculação da formulação A3.

Tabela 7. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A4 (*L. fermentum* ATCC 9338)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	6,47	6,47	6,88	36,0	35,2	35,4	-	-	-	-	-	-
DD	5,50	9,57	9,17	35,6	34,9	35,0	-	-	-	-	-	-
TE	5,50	8,46	9,57	35,5	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
TD	5,95	9,57	9,57	35,8	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
Média[z]	5,65	9,20	9,43	35,6	35,0	35,0						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)

** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)

[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)

z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas

Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

Os resultados obtidos na avaliação de inocuidade da formulação A4 (Tabela 7) demonstraram que, em 24 horas, a formulação contendo a cepa *L. delbrueckii* UFV H2B20 induziu aumento de 42,19% nos níveis de condutividade elétrica do leite dos tetos tratados (9,43 mS/cm) em relação ao teto controle (6,88 mS/cm) e 62,83% em relação aos valores apresentados no tempo inicial (de 5,45 para 9,43 mS/cm), resultados que indicam tetos saudáveis no tempo inicial e com mastite após 24 horas. Condições semelhantes foram observadas em 48 horas.

Observa-se ainda que, em relação à temperatura dos tetos tratados com a formulação A4 não foi observado alteração superior a 0,6 ºC após 48 horas do teste em relação ao controle e ao tempo inicial, o que indica que a formulação avaliada não induziu febre no animal. Apesar do aspecto do leite não ter sido alterado durante a avaliação e o animal não apresentar sinais clínicos de inflamação no úbere, os resultados de CEL indicam um quadro de mastite subclínica nos tetos tratados.

No tocante à formulação A5 (Tabela 8), a média da CEL dos tetos tratados (10,01 mS/cm) foram aproximadamente 36,56% superiores ao valor do teto controle (7,33 mS/cm) e 53,68% em relação ao tempo inicial (6,96 mS/cm) após 24 horas. Resultados semelhantes foram observados após 48 horas do

tratamento, sendo que o leite dos quartos tratados apresentaram incremento da CEL de 26,33% em relação ao teto controle e 29,06% em relação ao tempo inicial.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros referentes a avaliação da inocuidade da formulação A5 (*L. plantarum* ATCC 8014)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	7,10	7,33	7,10	36,0	35,2	35,4	-	-	-	-	-	-
DD	8,46	10,48	10,00	35,6	34,9	35,0	-	-	-	-	-	-
TE	6,11	9,57	8,46	35,5	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
TD	6,29	10,00	8,46	35,8	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
Média[z]	6,95	10,01	8,97	35,6	35,0	35,0						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)
** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)
[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)
z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas
Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

Estes resultados demonstram que, embora o animal não tenha manifestado qualquer sinal clínico de inflamação nos tetos e o leite não tenha apresentado alterações em seu aspecto, os valores de CEL dos tetos tratados indicam que os mesmos estavam saudáveis no tempo inicial e apresentaram um quadro de mastite subclínica após 24 horas do tratamento com a referida formulação.

No tocante à temperatura dos quartos mamários não houve alteração que demonstrasse indução de febre pela formulação A5 e não foram observadas alterações no aspecto do leite ou sinais indicativos de inflamação no úbere do animal.

A Tabela 9 apresenta os resultados relacionados à avaliação da inocuidade da formulação A6.

Tabela 9. Parâmetros referentes à avaliação da inocuidade da formulação A6 (*L. paracasei* ST11)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	7,86	7,59	7,33	35,2	35,0	35,5	-	-	-	-	-	-
DD	7,86	8,46	9,17	35,1	35,0	35,5	-	-	-	-	-	-
TE	7,59	8,80	8,80	35,4	35,0	35,1	-	-	-	-	-	-
TD	9,57	10,48	10,48	35,1	35,0	35,0	-	-	-	-	-	-
Média[z]	8,43	9,25	9,48	35,2	35,0	35,2						

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos e/ou coloração amarelada (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)
** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)
[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)
z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas
Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

No tocante à temperatura dos tetos testados com a formulação A6, não houve alteração que sugerisse febre no animal, nem foram observadas alterações no aspecto do leite ou sinais indicativos de inflamação no úbere do animal.

No entanto, os resultados de CEL, relativos a 24 horas do teste, foram 21,87% superiores ao nível encontrado no teto controle e 9,73% em relação tempo inicial. Em 48 horas, a média da condutividade do leite dos tetos tratados foi 29,33% maior que o controle, e 12,46% superior em relação à média inicial. É possível ainda verificar na Tabela 9 que, no tempo inicial, os tetos apresentavam valores de CEL levemente superiores ao limite interpretado como mastite subclínica. Porém, observou-se que o tratamento com a formulação A6 induziu ao aumento da CEL, fazendo com que os tetos tratados passassem ao quadro de mastite subclínica com tendência a evolução para mastite clínica.

A Tabela 10 apresenta os resultados do estudo de inocuidade relacionados à formulação A7.

Tabela 10. Parâmetros referentes à avaliação da inocuidade da formulação A7 (*Pool*)

Teto[]	Condutividade Elétrica (mS/cm)[Y]			Temperatura (°C)			Aspecto do leite*			Sinais clínicos de inflamação**		
	Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)			Tempo (h)		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
DE	7,86	7,59	7,33	35,2	35,0	35,5	-	-	-	-	-	-
DD	7,86	8,46	9,17	35,1	35,0	35,5	-	-	-	-	-	-
TE	7,59	8,80	8,80	35,4	35,0	35,1	-	-	-	-	-	-
TD	9,57	10,48	10,48	35,1	35,0	35,0	-	G+++	G++	-	-	-
Média[z]	6,07	10,24	9,82									

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos (G) e/ou coloração amarelada (CA) (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)

** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor (1), hiperemia (2) e/ou inchaço da glândula ou teto (3) (-: ausente)

[] = Tetos (Controle - DE: dianteiro esquerdo) e (Tratados - DD: dianteiro direito; TE: traseiro esquerdo; TD: traseiro direito)

z = Valor médio de condutividade elétrica do leite e de temperatura dos tetos tratados, nos tempos Inicial, 24 e 48 horas

Y = Limite estabelecido pela Dramiński convertido pela equação CEL (em mS/cm) = (2200/Leitura): abaixo de 7,3 mS/cm = teto sadio; entre 7,3 e 8,8 mS/cm = mastite subclínica; acima de 8,8 mS/cm = mastite subclínica tendendo a mastite clínica.

Os resultados observados no teste de inocuidade com a Formulação A7 demonstram que, após 24 horas, houve um aumento de 34,91% no valor médio da condutividade elétrica do leite dos tetos tratados (10,24 mS/cm) em relação ao controle (7,59 mS/cm), e 68,70% em relação aos valores observados no tempo inicial (6,07 mS/cm). Ao final das 48 horas, verificou-se um incremento de 33,97% em relação ao teto controle e de 61,78% (9,82 mS/cm) em relação ao tempo inicial.

Embora o animal não tenha manifestado qualquer sinal clínico de inflamação nos tetos tratados, destaca-se a presença de um resíduo no leite do teto traseiro direito (TD), nos tempos de 24 h (severa) e 48 horas (mediana), bem como o aumento da CEL a níveis elevados.

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 a 10 permitem observar que as diferentes formulações avaliadas provocaram aumentos na CEL quando comparados aos respectivos controles e tempo inicial de aplicação. Verificou-se ainda que alguns animais manifestaram o sentimento de dor e inchaço nos tetos tratados, compatível com quadro de mastite clínica, apesar da temperatura dos respectivos quartos mamários ter se mantido inalterada.

O aumento na condutividade elétrica do leite observado nos tetos tratados, indicam que os respectivos quartos mamários, considerados sadios no tempo inicial, podem ter desenvolvido uma inflamação leve sem sinais aparentes de dano a saúde dos animais, o que pode ser considerado uma mastite subclínica.

O incremento na condutividade elétrica no leite dos quartos tratados se deve ao aumento do teor de íons cloreto no leite, em razão da resposta imunológica à presença de micro-organismos no sistema mamário do animal. Zafalon et al. (2005) demonstraram existir uma relação direta entre a condutividade elétrica e teores de íon cloreto no leite. Na presença de infecção, a resposta inflamatória induz ao aumento da permeabilidade capilar na região inflamada, o que permite a passagem de células do sistema imune (somáticas) e íons cloreto do sistema sanguíneo do animal para os alvéolos da glândula mamária, local onde é produzido o leite (NIELEN et al., 1992).

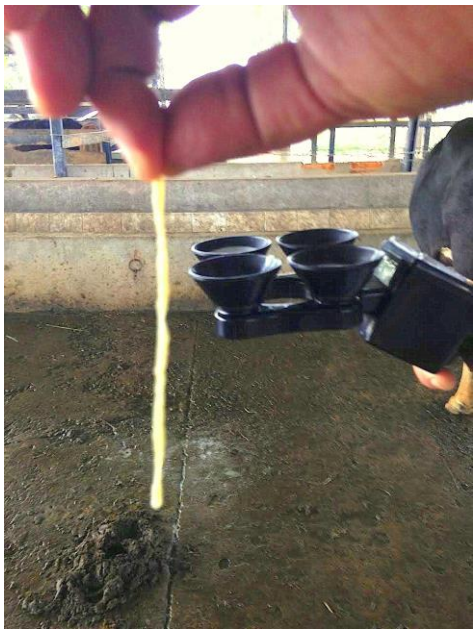
Considerando que alguns animais apresentaram dor e presença de resíduos no leite dos tetos tratados (Figuras 1 e 2), sugere-se que dependendo da susceptibilidade do animal, esta mastite subclínica pode evoluir para a forma clínica.

No tocante às variações observadas nos valores de CEL, temperatura do quarto mamário, bem como aspecto do leite, é válido salientar que estes resultados, considerados insatisfatórios, se devem provavelmente à presença de células das respectivas cepas de *Lactobacillus* no úbere, bem como a componentes da emulsão base utilizada como veículo no preparo das formulações A1 a A7. Assim, pode-se inferir que esta emulsão base, composta por 22% de componentes oleosos, não apresentou boa dispersão no leite, ou tampouco boa absorção pelo tecido da cisterna do teto, o que levou ao seu acúmulo neste compartimento da glândula mamária.

Assim, sugere-se que a presença de resíduos da emulsão base, bem como à presença dos lactobacilos podem ter sido reconhecidos como antígenos e desencadeado uma resposta do sistema imunológico do animal.

Ressalta-se que o leite contendo os resíduos observados nas Figuras 1 e 2 foi descartado.

Figura 1. Aspecto do resíduo observado no leite resultante dos tetos tratados com a formulação A7



Fonte: *do autor*

Figura 2. Ocorrência de resíduos na peneira do filtro de leite (Formulação A7)

Fonte: *do autor*

As Formulações A1 a A7 apresentaram resultados insatisfatórios, fazendo com que os animais sadios desenvolvessem alguma forma de inflamação nos quartos mamários após a inoculação com as formulações testadas, sendo que os animais tratados com as Formulações A1, A3 e A7 apresentaram características

de mastite clínica e aqueles tratados com as Formulações A2, A4, A5 e A6 apresentaram quadro compatível com a forma subclínica da doença.

Sugere-se que este quadro inflamatório da glândula mamária se deve a uma resposta do organismo do animal à presença dos micro-organismos probióticos e/ou até mesmo de algum componente da formulação.

O sistema imune reage a qualquer molécula ou célula que seja reconhecido como “não próprio” do organismo, o que pode se dar, por exemplo, pelo reconhecimento de antígenos de superfície dos micro-organismos probióticos administrados. Neste caso, o probiótico é reconhecido como um antígeno e desencadeia a reação inflamatória, independentemente de sua patogenicidade. Os efeitos combinados de células do sistema imune, tais como linfócitos T e B, neutrófilos e macrófagos, bem como de certas proteínas como anticorpos, interleucinas e proteínas do sistema complemento produzem uma resposta inflamatória (LEVINSON, 2014).

Segundo Oviedo-Boyso et al. (2007), em caso de invasão de um micro-organismo no quarto mamário, a resposta inflamatória se inicia primeiramente pelo reconhecimento deste por macrófagos presentes no leite e nos tecidos. Em resposta, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias, que induzem o recrutamento de neutrófilos, bem como produzem prostaglandinas e leucotrienos, o que incrementa a reação inflamatória no local. O recrutamento de neutrófilos é realizado por intermédio de substâncias denominadas interleucinas (IL-8 e IL-12) e por componentes do sistema complemento, tais como C3a e C5a, conhecidos como anafilotoxinas. Desta forma, o aumento na CCS que se observa durante a mastite decorre da migração transendotelial de leucócitos, atraídas ao local da infecção por quimiotaxia, o que tem grande importância na fisiopatologia da doença.

4.3.2 Formulação B

Grupo B1

Tendo em vista que os resultados relativos a avaliação das diferentes formulações, identificadas como A1 a A7, foram insatisfatórios, optou-se por avaliar uma nova formulação (B), tendo como base um veículo encontrado em

preparação comercial. Esta avaliação foi realizada em outros animais, distribuídos em dois grupos diferentes, sendo um deles pertencente ao sítio 1 e outro ao sítio 2, conforme descrito no item 3.5.

Desta forma, criou-se o grupo B1, cujos animais foram tratados com a formulação B contendo aproximadamente 1×10^9 células do *pool* de micro-organismos probióticos, conforme delineamento previamente descrito no item mencionado. Para avaliar a inocuidade da referida preparação avaliou-se além da observação do aspecto e condutividade elétrica do leite, temperatura dos quartos mamários, o índice de CMT (*California Mastitis Test*) e CCS (Contagem de Células Somáticas), cujos resultados se encontram apresentados na Tabela 11.

É possível observar que a média das temperaturas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os quartos mamários tratados e os respectivos controles.

Observa-se ainda que, após 24 horas, a média dos valores de condutividade elétrica do leite (CEL) oriundo dos quartos tratados (9,4 mS/cm) foi aproximadamente 57% superior à média dos valores dos tetos controles (6,0 mS/cm) e 67% superior ao tempo inicial (5,6 mS/cm). Após 48 horas, observa-se um aumento de 62% no valor da CEL em relação aos quartos controles. Ressalta-se que os quartos tratados apresentaram valores médios de CEL correspondentes a portadores de mastite subclínica, considerando os valores adotados pelo fabricante do Detector de Mastite utilizado no presente trabalho.

A análise estatística referente aos resultados de CEL demonstra que o grupo de animais tratados com a preparação apresentou médias significativamente ($p < 0,05$) superiores em relação aos quartos controle, após 24 e 48 horas, bem como em relação ao tempo inicial.

Assim, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, é possível inferir que após 24 horas os quartos tratados apresentaram valores médios de CEL equivalentes a presença de mastite subclínica com potencial para evoluir para a forma clínica (9,4 mS/cm). Por outro lado, o leite dos quartos controle apresentaram valores médios de CEL dentro do limite de classificação como normal (6,0 mS/cm), o que atesta sua condição saudável. Após 48 horas, é possível observar a confirmação deste quadro pela comparação entre as médias dos grupos tratados (10,2 mS/cm) e controle (6,3 mS/cm), os quais são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Destaca-se que o grupo tratado apresentou médias de CCS de $5,6 \times 10^6$ e $6,5 \times 10^6$ células/mL após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente, os quais foram significativamente ($p < 0,05$) superiores aos respectivos controles $4,2 \times 10^2$ e $6,6 \times 10^2$ células/mL após 24 e 48 horas, respectivamente.

Destaca-se que, após 24 horas o incremento da CCS no grupo tratado variou em aproximadamente 1,1 $\log_{10}$ células/mL em relação ao grupo controle, sendo que após 48 horas esta variação foi de 1,0 $\log_{10}$ células/mL.

Da mesma forma, após 24 horas, a CCS do grupo tratado apresentou incremento significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 1,9 $\log_{10}$ células/mL quando comparado com o tempo inicial. A diferença estatística também foi observada entre os tempos inicial e 48 horas, com aumento de aproximadamente 2,0 $\log_{10}$ células/mL.

Os resultados observados no grupo tratado corroboram a afirmação de que estes tetos apresentavam quadro compatível com o de mastite. Segundo NMC (1999), embora não exista um valor de referência da CCS para se classificar um teto como infectado, contagens superiores a 200.000 células/mL, normalmente indicam uma anormalidade e a probabilidade de uma irritação do tecido mamário.

Os valores médios de CCS obtidos no teste de inocuidade da formulação B foram superiores aos estabelecidos na legislação brasileira, que determina valores inferiores a 500.000 células/mL de leite (BRASIL, 2011).

Em relação aos resultados do *California Mastitis Test* (CMT) (Tabela 11), destaca-se que todos os animais do grupo tratado apresentaram escore 2 nos 10 tetos nos tempos 24 e 48 horas, correspondendo a uma condição de presença de infecção.

Verifica-se que, de maneira semelhante ao observado com a formulação A7, que também continha o *pool* de *Lactobacillus*, a formulação B induziu resposta imunológica nos animais, uma vez que os índices de condutividade elétrica, escore de CMT e CCS do leite dos tetos tratados apresentaram valores significativamente superiores aos tetos controle ($p < 0,05$).

Tabela 11. Valores médios dos parâmetros avaliados no experimento com o Grupo B1.

	Condutividade Elétrica (mS/cm) $(\overline{x} \pm SD)$			**Temperatura dos tetos (ºC)** $(\overline{x} \pm SD)$			**Log$_{10}$ CCS (células/mL)** $(\overline{x} \pm SD)$		
Tetos	**Tempo (h)**			**Tempo (h)**			**Tempo (h)**		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
Controle (n = 10)	5,9 ± 0,7[a]	6,0 ± 0,7[a]	6,3 ± 0,8[a]	35,5 ± 0,5[c]	35,7 ± 0,4[c]	35,7 ± 0,4[c]	4,57 ± 0,54[a]	5,53 ± 0,30[a]	5,67 ± 0,45[a]
Tratados (n=10)	5,6 ± 0,5[a]	9,4 ± 1,3[b]	10,2 ± 0,9[b]	35,6 ± 0,5[c]	35,8 ± 0,4[c]	35,7 ± 0,5[c]	4,42 ± 0,55[a]	6,71 ± 0,20[b]	6,81 ± 0,04[b]
Valor T	0,911465	7,261609	8,841266	0.047782	0.029446	0.139757	0,5258	**2,3973**	**3,1829**
Valor P	0,374096	0,00001	0,00001	0,96214	0.976663	0.88959	0,3025	**0,0134**	**0,0245**

	CMT (escore)+			**Aspecto do leite***			**Sinais clínicos de inflamação****		
	Tempo (h)			**Tempo (h)**			**Tempo (h)**		
	Inicial	24	48	Inicial	24	48	Inicial	24	48
Controle (n = 10)	N (n=8) T (n=2)	N (n=7) T (n=3)	N (n=7) T (n=3)	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente
Tratados (n=10)	N (n=9) T (n=1)	2 (n=10)	2 (n=10)	-	G+++: 4TD	-	Ausente	Ausente	Ausente

a; b; c = letras diferentes significam que os valores apresentam diferença estatística entre as médias; letras iguais significam que entre as médias não foram encontradas diferenças significativas, independente de estarem entre colunas ou linhas diferentes, considerando $p < 0.05$.

n = número de amostras observadas

+ = escores do CMT (N = Negativo; T = Traço (suspeito); 1 = suspeito; 2 = positivo; 3 = positivo)

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos (G) e/ou coloração amarelada (CA) (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)

** = Sinais clínicos de inflamação avaliado em relação à presença de dor, hiperemia e/ou inchaço da glândula ou teto (-: ausente)

*** = O número se refere ao animal e as letras fazem referência ao seu respectivo quarto mamário (DE: diant esquerdo; DD: diant. direito; TE: tras. esquerdo; TD: tras. direito)

Frola et al. (2012) observaram um aumento na contagem de células somáticas, de 2×10^5 para 6×10^6 células/mL e o aparecimento de grumos no leite dos tetos inoculados, 24 horas após infusão intramamária de uma suspensão de células de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 na concentração de 10^9 UFC/mL em salina, sendo que os grumos desapareceram 48 horas após o teste, conforme relatado pelos autores.

Tendo em vista que o veículo utilizado na formulação B foi fornecido por uma empresa multinacional farmacêutica, utilizado como veículo de uma preparação antibiótica para cura de mastite disponível no mercado e, portanto, devidamente aprovada em testes de inocuidade. No entanto, a partir destes resultados não se pode inferir que a reação provocada no sistema imunológico dos animais e as alterações apresentadas no leite tenham sido provocadas apenas pela presença dos micro-organismos integrantes do *pool* de cepas de *Lactobacillus*, ignorando a influência de possíveis componentes da formulação B, uma vez que não foi conduzido um experimento (controle) de inocuidade utilizando apenas o veículo.

A Tabela 12 apresenta os resultados da avaliação microbiológica das amostras do leite obtido dos animais submetidos ao tratamento com a Formulação B.

Tabela 12. Micro-organismos presentes no leite dos animais do grupo B1.

	Ocorrência de micro-organismos		
Tetos	**Tempo (h)**		
	Inicial	24	48
Controle (n = 10)	*Staphylococcus* n = 2	*Staphylococcus* n = 2	*Staphylococcus* n = 1
Tratados (n=10)	*Staphylococcus* n = 2 *Streptococcus*. n = 1	*Staphylococcus* n = 3 *Streptococcus*. n = 1	*Staphylococcus* n = 5 *Streptococcus*. n = 1

n = número de tetos observados

Observa-se que no tempo inicial, amostras de leite de 5 dos 20 tetos apresentavam infecção, verificado pela presença de colônias de micro-organismos em ágar sangue, as quais foram devidamente identificadas por meio de testes bioquímicos, morfotintoriais e em relação ao padrão de hemólise. Desta forma, verificou-se que 1 quarto mamário se encontrava infectado com células do

gênero *Streptococcus* e 5 com *Staphylococcus.* No entanto, não há evidências de que esta infecção tenha contribuído com o aumento da CCS ou CEL de modo a influenciar os resultados observados, uma vez que as amostras de leite dos quartos controle apresentaram resultados estáveis e normais de CCS, CEL e escores de CMT, bem como o aspecto do leite permaneceu inalterado ao longo das 216 horas do ensaio. Não foi evidenciado crescimento microbiano em ágar MacConkey.

A presença de micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* no leite dos tetos tratados não permite concluir que os resultados observados (incremento na CCS no experimento com o grupo B1) sejam apenas decorrentes da presença dos micro-organismos probióticos infundidos nos quartos mamários, uma vez que a resposta inflamatória pode ter sido desencadeada tanto pela presença dos agentes patogênicos como pelos probióticos.

Desta forma, sugere-se que novos ensaios devam ser conduzidos levando-se em consideração uma seleção mais criteriosa dos animais, submetendo-os a testes microbiológicos que permitam atestar a ausência de micro-organismos patogênicos nos quartos mamários, e tornar válido o teste de inocuidade das formulações.

Grupo B2

Considerando que a avaliação da formulação B nos animais do grupo B1 provocou mastite nos animais submetidos ao tratamento e que este resultado pudesse ser devido à concentração de *Lactobacillus,* foi proposto um novo delineamento experimental (item 3.5), que consistiu em se avaliar a mesma preparação probiótica (formulação B2) contendo uma concentração celular 1000 vezes menor (10^6 células/dose) e cujos resultados se encontram apresentados nas Tabelas 13 a 16.

Observa-se que a CCS das amostras de leite originadas dos animais tratados com a formulação B2 após 120 horas apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) superiores àquelas verificadas nos tetos mantidos como controle.

Tabela 13. Valores médios dos resultados de Contagem de Células Somáticas (CCS) medida no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2.

	Log CCS (células/mL) $(\overline{x} \pm SD)$						
Tetos	**Tempo (h)**						
	Inicial	24	48	72	96	120	216
Controle (n = 10)	5,39 ± 0,63	4,72 ± 0,62[a]	4,85 ± 0,59[a]	5,10 ± 0,58[a]	4,79 ± 0,91[a]	4,41 ± 1,17[a]	4,74 ± 1,06[a]
Tratado (n=10)	5,26 ± 0,49[a]	5,59 ± 0,53[a]	5,83 ± 0,52[b]	6,22 ± 0,48[b]	6,28 ± 0,60[b]	6,30 ± 0,43[b]	5,77 ± 0,71[a]
	Teste "*t de Student*" do grupo Testado em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$)						
Valor T	0,3325	0,9700	1,5350	1,2144	0,9778	**2,5512**	0,2086
Valor P	0,3706	0,1690	0,0665	0,7882	0,1844	**0.0074**	0,4179
	Teste "*t de Student*" do grupo Testado em relação ao tempo inicial ($p < 0,05$)						
Valor T		0.1913	0,3516	0,1167	0,6027	**2,3462**	0,4154
Valor P		0.4246	0.3635	0,4538	0,2751	**0,0055**	0,3401

a; b = letras diferentes significam que os valores apresentam diferença estatística entre as médias; letras iguais significam que entre as médias não foram encontradas diferenças significativas, independente de estarem entre colunas ou linhas diferentes, considerando p < 0.05.

Em relação ao tempo inicial, houve incremento significativo na média dos valores dos tetos tratados após 120 horas ($p < 0,05$).

É importante destacar que os resultados da CCS das amostras de leite dos tetos tratados revelaram contagens acima de 10^6 células/mL após 48 horas, nível que se manteve até 216 horas após a aplicação da formulação B2.

Embora a análise estatística dos resultados tenha demonstrado que, após 24 horas, a média da CCS do grupo tratado (841000 células/mL) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos tetos mantidos como controle e ao tempo inicial, é importante salientar que esta média foi superior ao limite exigido na legislação (BRASIL, 2011).

Desta forma, a formulação B2 não pode ser considerada inócua em relação ao animal, uma vez que induziu ao aumento significativo ($p < 0,05$) da CCS nas amostras de leite dos tetos tratados.

A contagem de células somáticas se refere à concentração de leucócitos no leite, o que é interpretado como uma resposta do sistema imunológico do animal à presença de um estímulo inflamatório como por exemplo a presença de bactérias. Crispie et al. (2008) demonstraram que a inoculação de uma cultura de bactérias láticas em quartos mamários sadios estimula o recrutamento de

linfócitos e polimorfonucleares após 24 horas.

Em relação aos resultados do *California Mastitis Test*, (Tabela 14) é possível verificar que 6 dos 8 tetos que inicialmente apresentaram escore negativo (N) após 24 horas foram classificados como suspeitos de infecção, o que foi evidenciado pelo escore T (traços) que indica o incremento da concentração de células somáticas no leite.

Tabela 14. Frequência dos escores de CMT observados no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2.

	Escore do *California Mastitis Test* (CMT)*						
Tetos	**Tempo (h)**						
	Inicial	24	48	72	96	120	216
Controle (n = 10)	N(n = 3) T (n = 4) 1 (n = 2) 2 (n = 1)	N(n = 9) T (n = 1)	N (n = 10)	N (n = 9) T (n = 1)	N (n = 6) T (n = 3) 1 (n = 1)	N (n = 6) T (n = 2) 1 (n = 2)	N (n = 5) T (n = 5)
Tratados (n=10)	N(n = 8) T (n = 1) 1 (n = 1)	N(n = 2) T (n = 6) 1 (n = 2)	N (n = 3) T (n = 5) 2 (n = 1)	N (n = 1) T (n = 1) 1 (n = 5) 2 (n = 3)	N (n = 1) 1 (n = 6) 2 (n = 3)	T (n = 3) 1 (n = 4) 2 (n = 3)	N (n = 3) T (n = 1) 1 (n = 5) 2 (n = 1)

*Relação dos Escores do CMT com diagnóstico de mastite subclínica : N = negativo; T = traços (suspeito); 1 = fortemente suspeito, 2 ou 3 = positivo para mastite subclínica

É possível observar que a partir de 48 horas após a administração da formulação B2, os tetos tratados manifestaram mastite subclínica, confirmado pelo valor de escore iguais a 1 e 2 (Tabela 14).

A Tabela 15 indica os valores de condutividade elétrica do leite após tratamento com a formulação B2

Tabela 15. Valores médios de condutividade elétrica do leite resultante da avaliação de inocuidade da formulação B2.

	Condutividade Elétrica (mS/cm) $(\overline{x} \pm SD)$						
Tetos	**Tempo (h)**						
	Inicial	24	48	72	96	120	216
Controle (n = 10)	7,47 ± 0,94	6,83 ± 0,93	6,78 ± 0,81	6,68 ± 0,80	6,66 ± 0,63	6,63 ± 0,65	6,67 ± 0,86
Tratados (n=10)	7,27 ± 0,67	7,46 ± 0,72	7,72 ± 0,75	7,80 ± 0,85	7,71 ± 0,89	7,99 ± 1,39	7,20 ± 1,09
Valor T	0.611792	0.729459	0.279616	0.777063	0.255122	0.62624	0.34566
Valor P	0.272159	0.470194	0.781288	0.441932	0.800005	0.534902	0.731505

No tocante aos resultados da Condutividade Elétrica no Leite, a análise estatística demonstrou que os valores médios dos tetos tratados não diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos tetos controle ou do tempo inicial. No entanto, não é possível afirmar que a formulação B2 seja inócua em relação aos animais, uma vez que foram observados aumentos da concentração de células somáticas e escore de CMT nos quartos tratados com a respectiva formulação.

Em relação ao aspecto do leite, observa-se na Tabela 16 que foram detectadas alterações no aspecto do leite após 72; 96 e 120 horas do ensaio.

Tabela 16. Frequência de alterações no aspecto do leite observados no experimento de avaliação de inocuidade com a formulação B2.

	Aspecto do Leite*						
Tetos	**Tempo (h)**						
	Inicial	24	48	72	96	120	216
Controle (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)
Tratados (n=10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 10)	N (n = 7) G + (n = 3)	N (n = 7) G + (n = 3)	N (n = 7) G + (n = 3)	N (n = 10)

n = número de amostras observadas

* = Aspecto do leite avaliado em relação à presença de grumos (G) e/ou coloração amarelada (CA) (índices: - ausente; + leve; ++ mediano; +++ severo)

No que se refere à avaliação microbiológica das amostras de leite dos animais submetidos ao tratamento com a formulação B2 (Tabela 17), verifica-se que no tempo inicial 17 dos 20 tetos avaliados apresentaram infecção, cujas colônias de micro-organismos cresceram em ágar sangue. O teste bioquímico de catalase, padrão de hemólise e propriedades morfotintoriais revelaram que estes agentes foram identificados como espécies de *Staphylococcus*. Destaca-se ainda que esta infecção não foi suficiente para causar danos à saúde dos animais, bem como alterar as características do leite, uma vez que os resultados de CCS, CMT e CEL, bem como o aspecto do leite dos tetos mantidos como controle permaneceram inalterados ao longo das 216 horas do ensaio.

Tabela 17. Número de amostras de leite contaminadas por *Staphylococcus* spp observada nas amostras de leite dos tetos avaliados no estudo de inocuidade da Formulação B2.

	Ocorrência de *Staphylococcus***						
Tetos	**Tempo (h)**						
	Inicial	24	48	72	96	120	216
Controle (n = 10)	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
Tratados (n=10)	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

n = número de amostras observadas; ** = número de amostras classificadas como positivas para infecção por *Staphylococcus* spp.

De forma geral, os resultados relativos a CCS, CMT e o aspecto do leite demonstraram que a formulação B2 induziu o surgimento de mastite nos tetos tratados, podendo esta situação ter sido causada tanto pela presença de células de *Lactobacillus* como pelos componentes do veículo comercial empregado no preparo da referida formulação. Desta forma, demonstrou-se que a redução da concentração de micro-organismos probióticos na formulação B2, de 10^9 para 10^6 células por dose, não alterou o efeito a negativo observado quando da avaliação da formulação B1.

Apesar dos resultados adversos observados nos testes de inocuidade para as formulações A1 a A7, B1 e B2, considerando o incremento de células do sistema imune no úbere do animal, testes de eficiência deverão ser conduzidos para avaliar o potencial de cura de infecções intramamárias mediada pela possível modulação do sistema imunológico do animal, e não apenas pela interação entre as espécies probióticas e patogênicas.

Vale salientar a escassez de trabalhos científicos no tocante a testes de inocuidade de formulações contendo micro-organismos probióticos, bem como antibióticos alopáticos, homeopáticos ou de outra natureza, no combate à mastite, dificultando o estabelecimento de parâmetros de comparação dos resultados observados no presente trabalho..

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

O estudo de inibição *in vitro* por meio da técnica co-cultura demonstrou que as cepas de *Lactobacillus* inibiram o crescimento das cepas patogênicas, em níveis superiores a 75% após 72 horas de cultivo, com destaque para as cepas *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20 e *L. plantarum* ATCC 8014, que apresentaram níveis de inibição superiores a 99% neste período;

Estudos de inocuidade demonstraram que as formulações A e B interferiram negativamente no estado de saúde dos tetos tratados, tendo como consequência alterações na condutividade elétrica do leite, nos escores de CMT, na CCS, bem como no aspecto do leite.

Os efeitos negativos observados com as formulações A e B se devem provavelmente à presença de *Lactobacillus*, bem como alguns de seus componentes.

O número reduzido de células *de Lactobacillus* na formulação B2 não interferiu nos efeitos negativos desta preparação sobre os parâmetros de inocuidade avaliados.

As formulações avaliadas não se mostraram adequadas ao emprego terapêutico no tratamento da mastite em bovinos de leite.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o efeito curativo das formulações probióticas em animais acometidos por mastite causada por *S. agalactiae*, considerando o aumento da concentração de células somáticas no sistema mamário do animal e a possível interação entre as espécies patogênica e probiótica *in vivo*.

Avaliar o efeito inibitório *in vitro* de substâncias presentes no sobrenadante do cultivo das cepas probióticas sobre as espécies patogênicas envolvidas na mastite bovina.

Investigar o potencial de produção de bacteriocinas pelas cepas de *Lactobacillus* estudadas.

Desenvolver formulações probióticas contendo o sobrenadante do cultivo de cepas probióticas, visando o tratamento da mastite.

REFERÊNCIAS

AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHAISUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. e31–e37, 2011.

AL-QUMBER, M.; TAGG, J. R. Commensal *bacilli* inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. **Journal of applied microbiology,** v. 101, n. 5, p. 1152-60, 2006.

ALMEIDA, R. A; OLIVER, S. P. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of dairy science,** v. 78, n. 6, p. 1310-7, 1995.

ALVIM, R.S. **Programa de qualidade do leite no Brasil.** Senado Federal. Audiência Pública. Disponível em: <http//www.senado.gov.br/sf/comissoes/cma/ap/AP_20071107_CNA_ContaminacaoLeite.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2012

ANAS, M.; EDDINE, H. J.; MEBROUK, K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus.* **World Journal of Dairy & Food Sciences,** v. 3, n. 2, p. 39-49, 2008.

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 the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. **Veterinary microbiology,** v. 134, n. 1-2, p. 150-6, 2009.

ARROYO, R.; MARTI, V.; MALDONADO, A.; JIME, E.; RODRI, J. M. Treatment of infectious mastitis during lactation: Antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. **Clinical Infectious Diseases,** v. 50, n. 12, p. 1551-1558, 2010.

BARBERIO, A.; LOCATELLI, C.; MULIARI, R.; BONAMICO, S.; BRONZO, V.; MORONI, P. Susceptibility to main antibiotics of Gram-negative bacteria from bovine mastitis in Italian herds. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL 52nd ANNUAL MEETING, 52., 2013, San Diego. **Proceedings**..., Verona: NMC, 2013. p. 181-2.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J.; BEIBOER, M. L.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. **Journal of dairy science,** v. 82, n. 8, p. 1643-54,1999.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C. Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na região do Triângulo Mineiro – Brasil. **Bioscience Journal,** v. 25, n. 6, p. 121- 128, 2009.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–6, 1966.

BELL, S. C.; GRUNDY, W. E. Preparation of agar wells for antibiotic assay. **Applied microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1611–1612, 1968.

BELOTI, V.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 18, n. 1, p. 45-53, 1997.

BENDALI, F.; MADI, N.; SADOUN, D. Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. e787–e794, 2011.

BONEV, B.; HOOPER, J.; PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1295–1301, 2008.

BOYER, M.; COMBRISSON, J. Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 1, p. 45–52, 2013.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 589–594, 2013.

BRADLEY, A. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. **The Veterinary Journal,** v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRANT, M. C; FIGUEIREDO, J. B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 46, n. 6, p. 595-606. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. e VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.51, n.2, p. 129-135, 1999.

CANTILHO, M.E.S.F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por *Lactobacillus* sp que apresentam propriedades probióticas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia

de Lorena, Universidade de São Paulo.

CAREY, C. M.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S.; THOMPSON, S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods,** v. 73, n. 2, p. 125-32, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 185–193, 2011.

CHEBEL, R. C. Mastitis effects on reproduction. In: **2007** NMC ANNUAL MEETING PROCEEDINGS, 2007, p. 43-55.

CRISPIE, F.; ALONSO-GÓMEZ, M.; O'LOUGHLIN, C.; KLOSTERMANN, K.; FLYNN, J.; ARKINS, S.; MEANEY, W.; ROSS, R. P.; HILL, C. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live *lactococci* on the mammary immune response. **The Journal of dairy research**, v. 75, n. 3, p. 374-84, 2008.

COUTINHO, T.S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

DAVIES, P. L.; ARCHER, S. C.; EMES, R. D.; BRADLEY, A. J.; LEIGH, J. A.; GREEN, M. J. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, n. October, p. 1-23, 2015.

DELUYKER, H.A.; GAY,J.M.; WEAVER,L.D. Interrelationships of somatic cell count, mastitis, and milk yield in a low somatic cell count herd. **Journal of Dairy Science,** v.76, n.11, p.3445 – 3452. 1993.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association,** v. 108, n. 3, p. 510- 21, 2008.

ĐURIČIĆ, D.; VALPOTIĆ, H.; SAMARDŽIJA, M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. **Animal reproduction science**, v. 159, p. 1–7, 2015.

ESPECHE, M. C.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; LARRIESTRA, A.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M. E. F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 103–109, 2012.

FABIAN, E.; ELMADFA, I. Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women. **Annals of nutrition & metabolism,** v. 50, n. 4, p. 387-93, 2006.

FABIAN, E.; MAJCHRZAK, D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in young healthy women. **Annals of nutrition & metabolism,** v. 52, n. 1, p. 29-36, 2008.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – ONU. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: < http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 04 dez. 2015.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf> Acesso em: 20 jun. 2012.

FÁVERO, S.; PORTILHO, F. V. R.; OLIVEIRA, A. C. R.; LANGONI, H.; PANTOJA, J. C. F. Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. **Livestock Science**, v. 181, p. 220–230, 2015.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural,** v. 31, n. 1, p. 95-98, 2001.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

FONSECA, G. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 29, n. 2, p. 451- 453, 2009.

FRATINI, F.; CASELLA, S.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; EBANI, V.V.; PISTELLI, L.; PISTELLI, L. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, v. 96, p. 1–7, 2014.

FREITAS, W. L. C. **Estudo do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Eimeria acervulina* (Tyzzer, 1929) em frangos de corte**. 2011. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.

FROLA, I. D.; PELLEGRINO, M. S.; ESPECHE, M. C.; GIRAUDO, J.A.;NADER-MACÍAS, M.E.F.; BOGNI, C.I. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. **The Journal of Dairy Research,** v. 79, n. 1, p. 84-92, 2012.

GAGGÌA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International journal of food microbiology,** v. 141, supl. 1, p. S15-S28, 2010.

GORDEN, P. J.; LIST, M. VAN DER; LEHMAN, F. D.; LANTZ, R. K.; CONSTABLE, P. D. Elimination kinetics of cephapirin sodium in milk after an 8-day extended therapy program of daily intramammary infusion in healthy lactating Holstein-Friesian cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 7, p. 4455–64, 2013.

GRANGETTE, C.; NUTTEN, S.; PALUMBO, E.; MORATH, S.; HERMANN, C.; DEWULF, J.; POT, B.; HARTUNG, T.; HOLS, P.; MERCENIER, A. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 102, n. 29, p. 10321-6, 2005.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; MADALENA, F. E., HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. et al. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – Minas Gerais, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.13, n.2, p.63-69, 2005.

HOSPIDO, A.; SONESSON, U. The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. **The science of the total environment,** v. 343, n. 1-3, p. 71-82, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Economia - Pesquisa Pecuária Municipal.** 2011. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab06.pdf. Acesso em 16.fev. 2012.

JOSHI, S.; GOKHALE, S. Status of mastitis as an emerging disease in improved and periurban dairy farms in India. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, n. 1, p. 74–83, 2006.

JUSTE, A.; THOMMA, B.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 745–761, 2008.

KARSKA-WYSOCKI, B.; BAZO, M.; SMORAGIEWICZ, W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbiological research,** v. 165, n. 8, p. 674-86, 2010.

KIJLSTRA, A.; EIJCK, I. A. J. M. Animal health in organic livestock production systems: a review. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences,** v. 54, n. 1, p. 77-94, 2006.

KIM, S. Y.; SHIN, S.; KOO, H. C. et al. In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. **Journal of dairy science,** v. 93, n. 8, p. 3610-5, 2010.

KLOCKE, P.; IVEMEYER, S.; BUTLER, G.; MAESCHLI, A.; HEIL, F. A randomized controlled trial to compare the use of homeopathy and internal teat sealers for the prevention of mastitis in organically farmed dairy cows during the dry period and 100 days. **Homeopathy**, v. 99, n. 2, p. 90–98, 2010.

KROMKER, V.; REINECKE, F.; PADUCH, J. H.; GRABOWSKI, N. Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 03, n. 04, p. 1–7, 2014.

LANGE-CONSIGLIO, A; SPELTA, C.; GARLAPPI, R.; LUINI, M.; CREMONESI, F. Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: first clinical application. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6223–30, 2014.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. F.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, n. 11, p. 881-886, 2009.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B.D. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 12ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 720p. ISBN 858055389X.

LOPES JÚNIOR, J. E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. S.; MORAES, L. C. D.; SOUZA, G.N. Relação entre contagem total de bactérias e contagem de células somáticas de quartos mamários infectados por patógenos da mastite. **Ciência Rural,** v. 42, n. 4, p. 691-696, 2012.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite - uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional,** v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MARTINEZ, R. C. R.; STALIANO, C. D.; VIEIRA, A. D. S.; Villarreal, M. L. M.; Todorov, S. D.; Saad, S. M. I.; Franco, B. D. G. M. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. **Food Microbiology**, v. 48, p. 143–152, 2015.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G. DA; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira,** v. 11, n. 1, p. 181- 187, 2010.

MIDDLETON, J. *Staphylococcus aureus* mastitis: Have we learned anything in the last 50 years?. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 2013, Portland. **Proceedings**... Verona: NMC, 2013. p. 1-8.

MILNE, M. H.; BIGGS, A.; BARRETT, D. C.; et al. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. **Veterinary Record**, v. 157, p. 245–250, 2005.

NAM, H. M.; LIM, S. K.; KANG, H. M.; KIM, J. M.; MOON, J. S.; JANG, K. C.; KIM, J. M.; JOO, Y. S. JUNG, S. C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 5, p. 2020–2026, 2009.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição,** v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

NATHAN, P.; LAW, E. J.; MURPHY, D. F.; MACMILLAN, B. G. A laboratory method for selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. **Burns**, v. 4, n. 3, p. 177–187, 1978.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Verona, WI, 1999.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R. DE; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NICKERSON, S. Contagious Pathogens. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. (Org.) **Encyclopedia of Dairy Science.** 2nd ed, Londres: Academic Press, 2011. v. 3. p. 408-414.

NIELEN, M.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y. H.; BRAND, A. Electrical Conductivity of Milk: Measurement, Modifiers, and Meta Analysis of Mastitis Detection Performance. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 2, p. 606–614, 1992.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57- 62, 2010.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

OLIVEIRA, L.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 12, p. 7538–49, 2013.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 297–305, 2015.

OLIVER, S. P.; PIGHETTI, G. M.; ALMEIDA, R.A. Environmental Pathogens. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. (Org.) **Encyclopedia of Dairy Science.** 2nd ed, Londres: Academic Press, 2011. v. 3. p. 415-421.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 165–85, 2012.

O'ROURKE, D. Assessment of cows for use of a nonantimicrobial dry cow product. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. Table 1, p. 1256–1260, 2005.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409, 2007.

OYETAYO, V. O.; OYETAYO, F. L. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2005.

PADUCH, J.-H.; MOHR, E.; KRÖMKER, V. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 02, p. 159–164, 2013.

PAULA, M. C.; RIBAS, N. P.; MONARDES, H. G.; ARCE, J.E.; ANDRADE, U.V.C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.33, n.5, p. 1303-1308, 2004.

PEIXOTO, E. C. T. M.; PELANDA, A. G.; RADIS, A. C.; HEINZEN, E. L.; GARCIA, R. C.; VALÉRIO, M. A. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** v. 64, n. 367/368, p. 66-71, 2009.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAI, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DILAMANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHAMARAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature,** v. 409, n. 6819, p. 529-33, 2001.

PILLAR, C. M.; STONEBURNER, A.; SHINABARGER, D. L.; ABBELOOS, E.; GOBY, L. In *vitro* susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of penicillin and framycetin: development of interpretive criteria for testing by broth microdilution and disk diffusion. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6594–607, 2014.

PINHO MANZI, M.; NÓBREGA, D. B.; FACCIOLI, P. Y.; TRONCARELLI, M. Z.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science,** v. 93, n. 1, p. 430-4, 2012.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1873–1892, 2011.

POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. **Journal of Dairy Science,** v. 90, n. 1, p. 249-61, 2007.

POPPI, L. B. **Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes***. 2005. 116 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena-SP, 2005.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSON, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848–61, 2011.

RABOT, S.; RAFTER, J.; RIJKERS, G. T.; WATZL, B.; ANTOINE, J. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. **The Journal of Nutrition,** p. 677S-689S, 2010.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GRÖHN, Y. T.; MCCULLOCH, C. E.; GUARD, C. L. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science,** v. 82, n. 6, p. 1213-20, 1999.

RANGEL, A. H. N.; MEDEIROS, H. R.; SILVA, J. B. A.; BARRETO, M. L. DE J.; LIMA JUNIOR, D. M. Correlação entre a contagem de células domáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.** v. 4, n. 3, p. 57-60, 2009.

REIMÃO, J. Q.; COLOMBO, F. A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; TEMPONE, A. G. *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 111–115, 2011.

REMUS, D. M.; KLEEREBEZEM, M.; BRON, P. A. An intimate tête-à-tête - how probiotic lactobacilli communicate with the host. **European journal of pharmacology,** v. 668 Suppl. 1, p. S33-42, 2011.

RENEAU, J.K. Somatic cell counts: Measures of farm management and milk quality. National Mastitis Council Annual Meeting, 40, 2001, USA. **Proceedings**..., Verona: NMC, 2001. p. 29-37.

REYES, J.; CHAFFER, M.; SANCHEZ, J.; et al. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5294–5303, 2015.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M C. Micro-organismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.

RILEY, L.W., REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; McGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N. T., BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine,** v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 271–88, 2012.

ROCA, M.; VILLEGAS, L.; KORTABITARTE, M. L.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Effect of heat treatments on stability of β-lactams in milk. **Journal of Dairy Science,** v. 94, n. 3, p. 1155-64, 2011.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **The Journal of Nutrition,** p. 396-402, 2000.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of mastitis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17–46, 2015.

RUEGG, P. L. The role of hygiene in efficient milking. **WCDS Advances in Dairy Technology,** v. 18, p. 285-293, 2006.

RUEGG, P. L. Risks, realities and responsibilities associated with mastitis treatments. **Proceedings of the Regional Meeting National Mastitis Council**. Anais... 2014. Disponível em: www.nmconline.org. Acesso em: 08 dez. 2015.

SADRZADEH-YEGANEH, H.; ELMADFA, I.; DJAZAYERY, A., JALALI, M.; HESHMAT, R.; CHAMARY, M. The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. **The British journal of nutrition,** v. 103, n. 12, p. 1778-83, 2010.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A; OLDE RIEKERINK, R. G. M.; SAMPIMON, O. C.; VAN SCHAIK, G. V.; LAM, T. J. G. M. Incidence of subclinical mastitis in Dutch dairy heifers in the first 100 days in lactation and associated risk factors. **Journal of dairy science,** v. 95, n. 5, p. 2476-84, 2012.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; LAM, T. J. G. M.; KEURENTJES, J.; SCHAIK, G. VAN. An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6965–6977, 2015.

SANTOS, M. V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Org.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos.** Juiz de Fora, 2003, v. 1, p. 139-149.

SANTOS, V. D. S. **Desenvolvimento de uma formulação probiótica para a prevenção e tratamento da mastite em bovinos.** 2015. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SCHAIK, G.. An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6965–6977, 2015.

SCHREINER, D. A; RUEGG, P. L. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. **Journal of dairy science,** v. 86, n. 11, p. 3460-5, 2003.

SCHUKKEN, Y. H.; GROMMERS, F. J.; GEER, D.; ERB, H. N.; BRAND, A. Risk Factors for Clinical Mastitis in Herds with a Low Bulk Milk Somatic Cell Count. 1. Data and Risk Factors for All Cases. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3463–3471, 1990.

SCHUKKEN, Y.; GONZALEZ, R.; TIKOFSKY, L.; SCHULTE, H.; SANTISTEBAN, C.; WELCOME, F.; BENNETT, G.; ZURAKOWSKI, M.; ZADOKS, R. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 9–14, 2009.

SCHULTZ, M.; WATZL, S.; LINDE, H.-J.; et al. Effect of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 (ECN) on experimental colitis in different animal models. **Gastroenterology**, v. 124, n. 4, p. A492, 2003.

SELLERA, F. P.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S.; GARGANO, R. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; POGLIANI, F. C. *In vitro* photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 6–11, 2015. In press.

SIDDIQUE, J.H.; LOKEN, K. I.; HOYT, H.H. Concentrations of neomycine, dihydrostreptomycine and polymyxine in milk after intramuscular or intramammary administration. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 146, p.594 -599, 1965

SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M. C.; FRANCA, A. P. Resíduos de antibióticos no leite e seus efeitos na saúde pública: uma preocupação constante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35. 2008, Gramado, RS. **Anais eletrônicos**... Gramado, RS: CONBRAVET, 2008. Disponível em: http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0568-1.pdf. Acesso em: 26 out. 2012.

SOARES, J. P. G.; CAVALCANTE, A. C. R.; HOLANDA JUNIOR, E. V. Agroecologia e sistemas de produção orgânica para pequenos ruminantes. In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA BRASILEIRAS, 5., 2006, Campo Grande, MS. **Anais eletrônicos**… Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/528796. Acesso em 15 jul. 2012.

SOLEIMANI, N. A.; KERMANSHAHI, R. K.; YAKHCHALI, B.; NEJAD, T. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 20, p. 2169-2173, 2010.

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

SOUSA, F. C. DE; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; SILVA, E. F. M. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites pasteurizados comercializados no estado do Ceará - Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 4, p. 10 – 14, 2010.

SUMITA, T. C. **Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto à propriedade probióticas**. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo. 2007

TEIXEIRA, P.; RIBEIRO, C.; SIMÕES, J. **Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros**: da teoria à prática**.** Ebook, PUBVET v.2, n.7, 2008. 54 p. ISSN 1982-1263. Disponível em: http://www.veterinaria.com.pt/. Acesso em: 12 mai. 2012

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos.** 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2011.

TODOROV, S. D.; PRÉVOST, H.; LEBOIS, M.; DOUSSET, X.; LeBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Carica *papaya)* — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1351-1363, 2011.

VLIEGHER, S. Coagulase-negative Staphylococci: an intriguing group of bacteria involved in bovine mastitis. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 2013, Portland. **Proceedings**... Verona: NMC, 2013. p. 9-13.

VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of molecular microbiology and biotechnology,** v. 13, n. 4, p. 194-9, 2007.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary microbiology,** v. 16, n. 1, p. 41-66, 1988.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 159–163, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Resultados obtidos no experimento de avaliação da inocuidade das formulações A1 a A7

Tabela A1. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A1

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A1					
Animal:	1					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. acidophilus* ATCC 4356					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura no Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	330	330	330	35,0	34,9	35,4
Dianteiro Direito (DD)	310	210	200	35,0	35,6	35,6
Traseiro Esquedo (TE)	360	230	210	35,0	35,4	35,8
Traseiro Direito (TD)	350	210	180	35,0	36,1	35,0

Tabela A2. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A2

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A2					
Animal:	2					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. casei* ATCC 7469					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura no Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	350	320	340	35,0	34,8	35,3
Dianteiro Direito (DD)	380	190	200	35,0	36,1	35,0
Traseiro Esquedo (TE)	400	200	200	35,6	35,3	36,2
Traseiro Direito (TD)	360	190	200	35,0	36,1	35,0

APÊNDICE A. Continuação

Tabela A3. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A3

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A3					
Animal:	3					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. delbrueckii* UFV H2B20					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	380	350	340	35,0	35,0	35,1
Dianteiro Direito (DD)	430	210	190	35,0	34,9	35,0
Traseiro Esquedo (TE)	440	230	210	35,1	35,0	35,0
Traseiro Direito (TD)	390	230	220	35,2	35,0	35,0

Tabela A4. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A4

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A4					
Animal:	4					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. fermentum* ATCC 9338					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	340	340	320	36,0	35,2	35,4
Dianteiro Direito (DD)	400	230	240	35,6	34,9	35,0
Traseiro Esquedo (TE)	400	260	230	35,5	35,0	35,0
Traseiro Direito (TD)	370	230	230	35,8	35,0	35,0

APÊNDICE A. Continuação

Tabela A5. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A5

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A5					
Animal:	5					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. plantarum* ATCC 8014					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura no Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	310	300	310	36,0	35,2	35,4
Dianteiro Direito (DD)	260	210	220	35,6	34,9	35,0
Traseiro Esquedo (TE)	360	230	260	35,5	35,0	35,0
Traseiro Direito (TD)	350	220	260	35,8	35,0	35,0

Tabela A6. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A6

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A6					
Animal:	6					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*L. paracasei* ST11					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura no Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	280	290	300	35,2	35,0	35,5
Dianteiro Direito (DD)	280	260	240	35,1	35,0	35,5
Traseiro Esquedo (TE)	290	250	250	35,4	35,0	35,1
Traseiro Direito (TD)	230	210	210	35,1	35,0	35,0

APÊNDICE A. Continuação

Tabela A7. Resultados obtidos no avaliação de inocuidade da Formulação A7

Propriedade	Sítio 1					
Fórmula Testada	A7					
Animal:	7					
Raça:	Mestiça					
Quartos inoculados:	TE, TD e DD					
Micro-organismo:	*Pool*					
Dose:	≅1× 10^9 células/mL					
Frequência	Única					
	Leitura no Mastitis Detector			**Temperatura (°C)**		
	Tempo			Tempo		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	280	290	300	35,2	35,0	35,5
Dianteiro Direito (DD)	280	260	240	35,1	35,0	35,5
Traseiro Esquedo (TE)	290	250	250	35,4	35,0	35,1
Traseiro Direito (TD)	230	210	210	35,1	35,0	35,0

APÊNDICE B. Resultados obtidos no experimento de avaliação da inocuidade das formulações B contendo o *pool* de micro-organismos a concentração aproximada de 1 × 10^9 células / dose

Propriedade:	Sítio 1				
Fórmulação Testada:	B	**Animais:**	1 a 5	**Raça**	Mestiça	**Quartos inoculados:**	TE, TD
Micro-organismo:	*Pool* de *Lactobacillus*	**Dose:**	≅1× 10^9 células/mL	**Frequência**	Única

Animal	**Leitura Mastitis Detector**			**Temperatura (°C)**			**CMT**			**CCS (× 1000/mL)**			**Presença de grumos**		
1	Dia			Dia			Dia			Dia			Dia		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	390	370	360	36,6	35,6	35,9	N	N	N	20	466	1511	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	460	430	420	35,7	36,0	35,6	N	N	N	12	356	848	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	450	300	240	36,6	36,2	35,8	N	2	2	27	5603	5957	N	+	+
Traseiro Direito (TD)	450	260	240	35,1	36,0	35,3	N	2	2	14	5771	7870	N	N	N

Animal	**Leitura Mastitis Detector**			**Temperatura (°C)**			**CMT**			**CCS (× 1000/mL)**			**Presença de grumos**		
2	Dia			Dia			Dia			Dia			Dia		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	340	360	300	35,1	35,2	35,5	N	N	N	12	681	698	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	380	400	360	35,0	35,3	35,8	N	N	N	29	444	337	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	380	260	240	36,1	35,3	35,6	N	2	2	6	5407	6220	N	N	+
Traseiro Direito (TD)	370	230	220	35,9	35,3	36,6	N	2	2	241	7529	6681	N	+	+

APÊNDICE B. CONTINUAÇÃO

Animal	Leitura Mastitis Detector			Temperatura (°C)			CMT			CCS (× 1000/mL)			Presença de grumos		
3	Dia			Dia			Dia			Dia			Dia		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	310	330	340	35,6	35,0	35,3	T	T	T	969	919	840	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	400	400	400	35,7	36,4	36,1	N	N	N	31	118	290	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	400	220	210	35,0	35,6	35,3	N	2	2	9	5950	5844	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	390	200	200	35,0	36,6	35,8	N	2	2	13	6827	6692	N	+	N

Animal	Leitura Mastitis Detector			Temperatura (°C)			CMT			CCS (× 1000/mL)			Presença de grumos		
4	Dia			Dia			Dia			Dia			Dia		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	330	300	290	35,5	36,2	35,3	T	N	T	108	707	272	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	420	410	390	35,0	35,9	36,0	N	N	N	21	148	34	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	400	200	200	35,2	35,7	35,8	N	2	2	21	5646	AC	N	N	+
Traseiro Direito (TD)	380	190	190	35,8	36,4	35,8	N	2	2	13	6052	AC	N	N	+

APÊNDICE B. CONTINUAÇÃO

Animal	Leitura Mastitis Detector			Temperatura (°C)			CMT			CCS (× 1000/mL)			Presença de grumos		
5	Dia			Dia			Dia			Dia			Dia		
Teto	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2	Inicial	1	2
Dianteiro Esquerdo (DE)	320	300	300	35,4	35,9	35,0	N	T	T	33	223	1227	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	380	360	360	35,0	35,6	36,4	N	T	N	29	166	558	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	380	260	220	36,0	35,4	35,0	N	2	2	29	1335	6428	N	+	+
Traseiro Direito (TD)	310	230	190	35,2	35,8	36,4	T	2	2	343	5624	5351	N	N	+

APÊNDICE C. Resultados de CCS obtidos no experimento de avaliação da inocuidade da formulação B contendo o *pool* de micro-organismos a concentração aproximada de 1 × 10^6 células / dose

Propriedade:	Sítio 2			**Fórmulação Testada:**	B
Animais:	1 a 5	**Raça**	Mestiça	**Quartos inoculados**	DD, TD
Micro-organismo:	*Pool* de *Lactobacillus*	**Dose**	≅1× 10^6 células	**Frequência**	1x/dia – 3 dias

Animal	**CCS (× 1000/mL)**						
1	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	35	8	19	307	89	3	235
Dianteiro Direito (DD)	236	61	195	704	485	1730	1908
Traseiro Esquedo (TE)	36	14	15	9	22	13	15
Traseiro Direito (TD)	490	349	876	6422	7978	8250	8954
2	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	114	24	53	72	1	1	1
Dianteiro Direito (DD)	84	511	1601	2399	3853	3180	798
Traseiro Esquedo (TE)	97	15	15	41	9	1	1
Traseiro Direito (TD)	79	1205	4183	1982	3853	1885	2561
3	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	82	16	15	24	9	1	7
Dianteiro Direito (DD)	33	277	328	1441	2876	563	40
Traseiro Esquedo (TE)	352	179	167	318	172	140	277
Traseiro Direito (TD)	128	60	85	122	85	5998	191
4	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	2105	351	734	343	318	265	422
Dianteiro Direito (DD)	1829	4530	3786	4713	8924	5123	674
Traseiro Esquedo (TE)	1073	45	136	201	1650	2102	645
Traseiro Direito (TD)	65	508	869	1764	755	452	103
5	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	0	252	224	509	151	122	390
Dianteiro Direito (DD)	237	649	667	947	1303	605	116
Traseiro Esquedo (TE)	1516	363	223	447	337	311	319
Traseiro Direito (TD)	418	258	269	5493	5046	2574	2243

APÊNDICE D. Resultados de CMT obtidos no experimento de avaliação da inocuidade da formulação B contendo o *pool* de micro-organismos a concentração aproximada de 1 × 10^6 células / dose

Propriedade:	Sítio 2			**Fórmulação Testada:**	B
Animais:	1 a 5	**Raça**	Mestiça	**Quartos inoculados**	DD, TD
Micro-organismo:	*Pool* de *Lactobacillus*	**Dose**	≅1× 10^6 células	**Frequência**	1x/dia – 3 dias

Animal	**CMT (escore)**						
Animal 1				Dia			
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	T	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	T	T	T	1	1	1
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	T	T	1	2	2	2
Animal 2				Dia			
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	T	2	2	1	1	1
Traseiro Esquedo (TE)	T	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	1	2	2	1	1	1
Animal 3				Dia			
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	T	T	1	1	T	N
Traseiro Esquedo (TE)	T	T	N	N	T	1	T
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	N	N	2	T
Animal 4				Dia			
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	1	N	N	N	N	T	T
Dianteiro Direito (DD)	1	1	T	1	2	1	1
Traseiro Esquedo (TE)	1	N	N	N	1	1	T
Traseiro Direito (TD)	N	T	N	1	1	T	N
Animal 5				Dia			
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	T	N	N	T	T	N	T
Dianteiro Direito (DD)	N	T	T	1	1	T	N
Traseiro Esquedo (TE)	2	N	N	N	T	T	T
Traseiro Direito (TD)	T	N	N	2	2	2	1

APÊNDICE D. Resultados de leitura do Mastitis Detector obtidos no experimento de avaliação da inocuidade da formulação B contendo o *pool* de micro-organismos a concentração aproximada de 1 × 10^6 células / dose

Propriedade:	Sítio 2			**Fórmulação Testada:**	B
Animais:	1 a 5	**Raça**	Mestiça	**Quartos inoculados**	DD, TD
Micro-organismo:	*Pool* de *Lactobacillus*	**Dose**	≅1× 10^6 células	**Frequência**	1x/dia – 3 dias

Animal	**Leitura Mastitis Detector (escore)**						
Animal 1	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	300	350	350	340	350	350	360
Dianteiro Direito (DD)	290	370	370	320	320	290	310
Traseiro Esquedo (TE)	340	380	390	380	350	350	360
Traseiro Direito (TD)	270	310	300	270	230	200	240
Animal 2	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	320	360	340	340	340	370	370
Dianteiro Direito (DD)	350	340	310	320	320	340	370
Traseiro Esquedo (TE)	340	390	380	380	380	390	390
Traseiro Direito (TD)	330	290	270	270	280	310	290
Animal 3	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	280	290	290	300	300	320	310
Dianteiro Direito (DD)	300	290	270	280	280	320	340
Traseiro Esquedo (TE)	270	270	290	280	280	290	280
Traseiro Direito (TD)	290	280	280	280	300	230	300
Animal 4	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	300	320	300	320	320	340	340
Dianteiro Direito (DD)	310	270	250	290	270	280	340
Traseiro Esquedo (TE)	340	350	360	400	370	340	360
Traseiro Direito (TD)	340	280	270	300	310	330	350
Animal 5	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	230	260	270	280	300	280	260
Dianteiro Direito (DD)	310	290	290	300	330	290	340
Traseiro Esquedo (TE)	270	310	320	320	340	320	320
Traseiro Direito (TD)	260	260	270	220	250	240	240

APÊNDICE E. Aspecto do leite observado no experimento de avaliação da inocuidade da formulação B contendo o *pool* de micro-organismos a concentração aproximada de 1 × 10^6 células / dose

Propriedade:	Sítio 2			**Fórmulação Testada:**	B
Animais:	1 a 5	**Raça**	Mestiça	**Quartos inoculados**	DD, TD
Micro-organismo:	*Pool* de *Lactobacillus*	**Dose**	≅1× 10^6 células	**Frequência**	1x/dia – 3 dias

Animal	**Presença de grumos no leite**						
Animal 1	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	+	+	+	N
Animal 2	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	+	+	+	N
Animal 3	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	N	+	N	N
Animal 4	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	N	N	N	N
Animal 5	Dia						
Teto	Inicial	1	2	3	4	5	9
Dianteiro Esquerdo (DE)	N	N	N	N	N	N	N
Dianteiro Direito (DD)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Esquedo (TE)	N	N	N	N	N	N	N
Traseiro Direito (TD)	N	N	N	+	N	+	N

ANEXO

ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UniFOA)

FOA

CEUA
Comitê de Ética no Uso de Animais

UniFOA

Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA - UniFOA)

PARECER Nº 006/15

PARECER

Certificamos que o **Protocolo** de nº **005/15**, relativo ao projeto intitulado: **"ESTUDO DA AÇÃO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM BOVINOS DE LEITE"**, tendo como pesquisador (a) **Ismael Maciel de Mancilha**, foi submetido ao **Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UniFOA**, em reunião realizada no dia **28/08/15**, e considerado **APROVADO**.

Volta Redonda, 02 de setembro de 2015.

Dimitri Ramos Alves
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA-UniFOA)

Prof. Dr. Dimitri Ramos Alves
Coordenador Comitê de Ética no Uso de Animais
FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
CEUA – UniFOA