

BRUNO GARCIA BOTARO

Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

São Paulo

2012

BRUNO GARCIA BOTARO

Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2541
FMVZ

Botaro, Bruno Garcia

Deteção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real / Bruno Garcia Botaro. – 2012.
96 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberto Benites.

1. Mastite subclínica contagiosa. 2. PCR quantitativo. 3. Composição do leite. 4. Produção de leite. 5. Amostra do quarto mamário I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação e contagem de agentes causadores de mastite bovina pela reação em cadeia da polimerase", protocolado sob o nº1332/2008, utilizando 300 (trezentos) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum" da referida Comissão.

We certify that the Research "Identification and counting of mastitis causing agents using polymerase chain reaction", protocol number 1332/2008, utilizing 300 (three hundred) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 13 de março de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOTARO, Bruno Garcia

Título: Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

RESUMO

BOTARO, B. G. Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real. [Detection and counting of bovine mastitis causative *Staphylococcus aureus* in milk samples by real-time polymerase chain reaction method]. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Os objetivos do presente estudo foram os de verificar a validade do método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detectar e quantificar o *Staphylococcus aureus* em amostras de leite conservadas com bronopol oriundas de quartos mamários bovinos subclínicamente infectados, e de avaliar os efeitos da presença e da quantidade de células da bactéria sobre a contagem de células somáticas (CCS), a composição do leite (lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira e caseína), e a produção de leite de quartos mamários bovinos subclínicamente infectados pelo patógeno. Para a quantificação do *S. aureus* e das células somáticas bovinas por meio do qPCR, foi utilizado leite cru bovino para o preparo dos padrões como meio de diluição da inoculação seriada de células somáticas e do *S. aureus* ATCC 29213, e construídas as equações $\log_{10}UFC = 37,86 - 23,54 \log_{10}Ct_{SAU}$ e $\log_{10}CCS = 49,3 - 34,0 \log_{10}Ct_{BMCB}$, com base nos resultados obtidos pelas metodologias de referência para cada procedimento. Para testar a equivalência dessas equações aos respectivos métodos de referência, determinar a sensibilidade e especificidade analíticas e a repetibilidade do método proposto, foram coletadas amostras de leite dos quartos mamários de 60 animais de 2 rebanhos leiteiros da região de Pirassununga dos quais se determinou previamente a ocorrência de casos subclínicos de mastite por *S. aureus*. Dos quartos mamários também foram mensuradas as produções e coletadas amostras de leite para análise de composição, diagnóstico da mastite, e determinação da sensibilidade e especificidade diagnósticas do procedimento de qPCR estabelecido no estudo. Cada amostra foi submetida à análise de composição, CCS, cultura microbiológica, contagem em placas do *S. aureus*, processadas para a extração do DNA genômico bovino e do *S. aureus*, e submetida à reação de qPCR. Para análise da concordância entre os resultados obtidos pelos métodos de referência para o diagnóstico da mastite por *S. aureus* e o de qPCR foi utilizado o teste Kappa. Para avaliação da equivalência das contagens obtidas pelos métodos de referência do *S. aureus* e de células somáticas bovinas, foi utilizado o teste das diferenças de Bland-Altman. Para a identificação do efeito da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a composição e produção de leite do quarto mamário afetado foi utilizada a análise da variância num delineamento em parcelas

subdivididas em faixas. Para estimar o grau de relação entre as contagens de *S. aureus*, a CCS, produção e composição do leite produzido pelo quarto mamário afetado foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. A correlação entre os resultados de contagem de células somáticas bovinas determinados pelos métodos de rotina e de qPCR para a quantificação de células somáticas apresentou coeficiente $r = - 0,978$ ($P < 0,001$). A correlação entre os resultados da contagem do *S. aureus* ATCC 29213 determinados pelos métodos de rotina e de qPCR para a quantificação do patógeno apresentou coeficiente $r = - 0,989$ ($P < 0,001$). A especificidade analítica do qPCR para a detecção do *S. aureus* em amostras de leite frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, os estafilococos coagulase-negativa, e as espécies coagulase-positiva *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* foi de 100%. O método de qPCR aplicado à detecção de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 em amostras de leite é replicável e apresentou sensibilidade analítica com limite de detecção para a faixa de 10 UFC/mL à $4,2 \times 10^6$ UFC/mL. Em amostras de leite conservadas com bronopol provenientes de quartos mamários subclínicamente infectados, o *S. aureus* pôde ser detectado, mas não pôde ser quantificado pelo método de qPCR. Nessas amostras, a CCS pôde ser determinada de forma equivalente ao método de rotina. A CCS independe da contagem de *S. aureus* viáveis, mas foi observada correlação linear e negativa entre o número total de células do patógeno e a CCS. A mastite subclínica pelo *S. aureus* aumentou a CCS nos quartos mamários, mas não alterou a composição do leite. A doença diminuiu a produção de leite e de gordura dos quartos mamários anteriores acometidos pela infecção, mas não se observou efeito da interação entre o posicionamento da glândula e a infecção sobre a produção de leite. Houve correlação entre as concentrações de lactose ($r = 0,42$; $P = 0,0051$), de gordura ($r = 0,46$; $P = 0,0016$), de produção de gordura ($r = 0,49$; $P = 0,001$), e de leite com produção ajustada para o teor de 3,5% de gordura ($r = 0,41$; $P = 0,006$), e o número de *S. aureus* presentes na amostra de leite.

Palavras-chave: Mastite subclínica contagiosa. PCR quantitativo. Composição do leite. Produção de leite. Amostra do quarto mamário.

ABSTRACT

BOTARO, B. G. **Detection and counting of bovine mastitis causative *Staphylococcus aureus* in milk samples by real-time polymerase chain reaction method.** [Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real]. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

The objectives of this study were to verify the validity of the real-time polymerase chain reaction (qPCR) to detect and quantify *Staphylococcus aureus* in bronopol-preserved milk samples from subclinically infected mammary quarters, and to assess the effects of the presence and amount of the pathogen on the somatic cell count (SCC), the composition of milk and milk yield of bovine mammary quarters subclinically infected by the pathogen. In order to quantify *S. aureus* and bovine somatic cells through qPCR, raw bovine milk was used as a means of serial inoculation media of somatic cells and *S. aureus* ATCC 29213. From that, equations based on the reference methods for each procedure were built, $\log_{10}\text{UFC} = 37,86 - 23,54 \log_{10}\text{Ct}_{\text{SAU}}$ and $\log_{10}\text{CCS} = 49,3 - 34,0 \log_{10}\text{Ct}_{\text{BMCB}}$, respectively. To test their equivalence with the reference methods, determine the analytical sensitivity and specificity, and repeatability of the proposed method, milk was sampled from quarters of 60 animals from two dairy herds in Pirassununga, where subclinical *S. aureus* mastitis cases had been previously diagnosed. Also, quarter milk yield had been measured and samples collected for milk composition analysis, diagnosis of mastitis, sensitivity and specificity of the procedure established in the study had been determined. Each sample was subjected to composition analysis, SCC, microbiological culture, plate counting of *S. aureus*, DNA extraction, and subjected to qPCR reaction. Agreement between results from reference methods and qPCR for the diagnosis of mastitis by *S. aureus* was assessed by Kappa test. Equivalence between *S. aureus*, SCC scores obtained by reference and qPCR was assessed with Bland-Altman procedures. The effect of *S. aureus* subclinical infection on milk composition and milk yield of affected quarters was measured using a strip plot design. To estimate the degree of relationship between the counts of *S. aureus*, SCC, yield and composition of the milk from affected quarters was assessed by the Pearson Correlation. Correlation between SCC determined by routine methods and qPCR was $r = - 0.978$ ($P < 0.001$). Correlation between *S. aureus* ATCC 29213 determined by routine methods and qPCR was $r = - 0.989$ ($P < 0.001$). Analytical specificity of qPCR to detect *S. aureus* in milk samples against *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

dysgalactiae, *Streptococcus uberis*, coagulase-negative staphylococci and coagulase-positive species, *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius* was 100%. The use of the qPCR to detect *S. aureus* ATCC 29213 in milk samples is replicable. Analytical sensitivity detection limit of the method ranged from 10 CFU/mL to 4.2×10^6 CFU/mL. *S. aureus* could be detected, but not quantified by qPCR in bronopol-conserved milk samples from subclinically infected quarters. In these samples, SCC could be determined by qPCR as it had been done by routine method. SCC was not dependent on *S. aureus* viable cells, but a negative linear correlation between the total number of cells of the pathogen and SCC was observed. *S. aureus* subclinical mastitis increased quarters SCC, but did not change milk composition. The disease decreased quarter milk and fat yield, but no interaction effect was observed between the gland positioning and *S. aureus* subclinical infection on milk production. Correlations between lactose ($r = 0.42$, $P = 0.0051$), fat ($r = 0.46$, $P = 0.0016$), fat yield ($r = 0.49$, $P = 0.001$), and 3.5% fat adjusted milk yield ($r = 0.41$, $P = 0.006$), and the number of *S. aureus* present in the milk sample were observed.

Keywords: Contagious subclinical mastitis. Quantitative PCR. Milk composition. Milk yield. Quarter milk sample.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	MASTITE CONTAGIOSA BOVINA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS	13
2.1.1	Epidemiologia da mastite por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.2	Mastite por <i>S. aureus</i> e CCS	17
2.1.3	Mastite por <i>S. aureus</i> e alterações da composição do leite	18
2.1.4	Contagem de <i>S. aureus</i> durante a infecção intramamária	19
2.1.5	Mastite por <i>S. aureus</i> e o impacto sobre a produção de leite pelo quarto mamário afetado	19
2.1.6	Diagnóstico da mastite por <i>S. aureus</i> por meio de microbiologia convencional	19
2.1.7	Diagnóstico da mastite por <i>S. aureus</i> por meio de metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase	21
2.2	PCR EM TEMPO REAL NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	22
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE QUANTIFICAÇÃO	25
4.1.1	Preparo dos padrões para quantificação	25
4.1.2	Metodologias para a construção das curvas de quantificação	27
4.1.2.1	Metodologias para detecção e quantificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Método de qPCR)	29
4.1.3	Construção das curvas padrão para as quantificações	31
4.2	COLETA DE AMOSTRAS EM FAZENDAS COMERCIAIS	32
4.2.1	Seleção dos rebanhos e animais para coleta	32
4.2.2	Coleta e preparo das amostras para análise	33
4.3	METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO DO LEITE	33
4.3.1	Determinação dos teores de lactose e gordura	33

4.3.2	Determinação da composição proteica	34
4.3.3	Contagem de células somáticas.....	35
4.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO S. AUREUS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA	35
4.5	CONTAGEM DE S. AUREUS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA	36
4.6	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO S. AUREUS PELO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL.....	36
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4.7.1	Determinação da sensibilidade e especificidade analíticas e repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR.....	37
4.7.2	Análise de concordância entre os métodos	38
4.7.3	Análise da equivalência entre os métodos de quantificação	38
4.7.4	Identificação do efeito da infecção subclínica por <i>S. aureus</i> sobre a composição e produção do leite	39
4.7.5	Estimativa das correlações.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO.....	41
5.2	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICAS, E DA REPETIBILIDADE DO MÉTODO DE QPCR PARA A DETECÇÃO DE S. AUREUS EM AMOSTRAS DE LEITE CONSERVADAS COM BRONOPOL.....	43
5.3	CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E CULTURA MICROBIOLÓGICA PARA O DIAGNÓSTICO DA MASTITE POR S. AUREUS	47
5.4	EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE CONTAGEM ELETRÔNICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS BOVINAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE CONSERVADAS COM BRONOPOL.....	50
5.5	EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE REFERÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO S. AUREUS EM AMOSTRAS DE LEITE	53
5.6	ESTIMATIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E A CONTAGEM DE S. AUREUS EM AMOSTRAS DE LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS	56

5.7	EFEITO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR S. AUREUS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE, GORDURA, PROTEÍNA BRUTA, PROTEÍNA VERDADEIRA E CASEÍNA, E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO QUARTO MAMÁRIO AFETADO PELO MICRORGANISMO.....	59
5.8	EFEITO DA MASTITE POR S. AUREUS SOBRE A PRODUÇÃO DO QUARTO MAMÁRIO AFETADO PELO MICRORGANISMO.....	67
5.9	ESTIMATIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE AS CONTAGENS DO S. AUREUS, AS CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE, GORDURA, PROTEÍNA BRUTA, PROTEÍNA VERDADEIRA E CASEÍNA, E A PRODUÇÃO DE LEITE DO QUARTO MAMÁRIO.....	75
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIA	80

1 INTRODUÇÃO

A mastite é considerada a enfermidade endêmica mais onerosa da produção leiteira bovina mundial (HALASA et al., 2007), e as perdas em sua consequência não impactam apenas o produtor de leite, mas também a indústria laticinista, pois afeta direta e negativamente propriedades físico-químicas e de composição do leite, necessárias para o processamento industrial da matéria-prima e dos produtos dela advindos (AULDIST; HUBBLE, 1998). Assim, uma vez que a intensidade da resposta imune na glândula mamária frente à infecção depende do agente causador (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003) e do grau em que este coloniza a glândula (COSTA; BENITES; MELVILLE, 1995), parece evidente que a produção e a composição do leite do quarto mamário com mastite clínica estejam alterados (COULON et al., 2002). Entretanto, aproximadamente 50% dos animais dos rebanhos leiteiros modernos no mundo são acometidos pela forma subclínica da doença (JÁNOSI; BALTAY, 2004; PITKÄLÄ et al., 2004), e poucos estudos (LEITNER et al., 2006; TESFAYE; REGASSA; KELAY, 2010) se detiveram a determinar a relação entre o agente causador da infecção subclínica e o seus efeitos sobre a produção e a composição do leite.

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é a bactéria mais comumente isolada de casos de mastite em rebanhos bovinos leiteiros de todo mundo, e no Brasil, não diferente, relata-se prevalência do patógeno em 32% das amostras de leite analisadas (CRUPPE et al., 2008). De elevada contagiosidade, as mastites causadas pelo patógeno são pouco responsivas aos protocolos terapêuticos usualmente adotados, e determinam perdas consideráveis ao produtor, que incluem decréscimo da produção de leite e redução de sua qualidade, aumento de custos veterinários, descarte prematuro de vacas e diminuição da expressão do potencial genético dos animais acometidos. Geralmente, o *S. aureus* determina infecções de longa duração, com altas contagens de células somáticas, e a manifestação da forma subclínica da doença, requerendo o isolamento do patógeno nas amostras de leite como diagnóstico definitivo da doença (TAPONEN et al., 2009). Para tanto, o método convencional para sua detecção baseia-se na coleta asséptica de amostra de leite do quarto acometido, envio para laboratório especializado, e isolamento microbiano por meio de cultura microbiológica (OLIVER et al., 2004). Entretanto, o tempo para a análise e as dificuldades de processamento de grande número de amostras, principalmente quando se faz acompanhamento de rebanhos e se necessita avaliar amostras repetidas vezes, dificultam a eficiência do diagnóstico. Outrossim, resultados

negativos (que podem ocorrer devido a inibição do crescimento do microrganismo, seja pela presença de resíduos de antimicrobianos na amostra, número reduzido do patógeno na amostra ou a presença de leucócitos nos casos clínicos) , sugerem que o método possa não ser suficientemente sensível para detectar quartos mamários com ciclos intermitentes de eliminação do *S. aureus* durante a lactação (PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001), e glândulas subclínicamente infectadas com baixa carga microbiana (SEARS; MCCARTHY, 2003b; TAPONEN et al., 2009).

Em função dessas limitações, protocolos para a detecção de patógenos causadores de mastite por meio de metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidos e apresentaram capacidade para determinação da etiologia da doença (JAYARAO et al., 1991; HIROSE et al., 2001; KIM et al., 2001; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; MEIRI-BENDEK et al., 2002; HUYGENS et al., 2006; KOSKINEN et al., 2009; TAPONEN et al., 2009).

Uma vez que o uso da contagem de células somáticas (CCS) individual tem se tornado cada vez mais frequente entre os produtores de leite, a justificativa para a realização deste estudo baseou-se na demanda por um método rápido para a detecção e contagem do *S. aureus* em nível individual a partir dessas amostras, o qual permitiria o adequado monitoramento da doença em rebanhos leiteiros. Neste último caso, tal procedimento proveria o produtor de informações para decisão entre o uso ou não de tratamento, ou a adoção de outras medidas de controle (segregação, descarte e secagem antecipada de animais acometidos), a fim de prevenir a contaminação dos animais sadios do rebanho. Ainda, em razão da elevada prevalência do patógeno nos rebanhos brasileiros, mensurar os efeitos da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a produção e a composição do leite auxiliaria a indústria à estabelecer medidas de controle junto a seus fornecedores, evitando as perdas tanto de produção de leite, quanto da qualidade dos produtos advindos de uma matéria-prima alterada pelos efeitos da mastite.

Assim, a hipótese testada neste estudo é a de que é possível a detecção e a quantificação do *S. aureus* em amostras de leite por meio do método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR); e de que não apenas a presença, mas também a quantidade de células de *S. aureus* alteram a composição do leite e a produção de leite pelos quartos mamários bovinos subclínicamente infectados pelo patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE CONTAGIOSA BOVINA E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

São definidas como contagiosas as mastites cujos agentes etiológicos são transmitidos entre vacas (SANTOS; FONSECA, 2006). Sob tal definição, portanto, muitos patógenos podem ser considerados contagiosos, mas poucos possuem contagiosidade à semelhança do *Staphylococcus aureus* (KEEFE, 1997; ZECCONI, 2006), e que de fato, continuam representando entraves à pecuária leiteira mundial (HALASA et al., 2007; HUIJPS; LAM; HOGEVEEN, 2008). Historicamente, a mastite, e especificamente a contagiosa, tinha etiologia atribuída exclusivamente ao *Streptococcus mastitidis*, que mais tarde teve sua classificação revista para *S. agalactiae* (FOX; GAY, 1993). De fato, o *S. agalactiae* foi o patógeno mais prevalente nos rebanhos leiteiros mundiais até meados de 1980 (KEEFE, 1997), mas a adoção de programas para o seu controle, baseado em antibioticoterapia intramamária durante a lactação, permitiu sua erradicação, e aumentou a prevalência do *S. aureus* (SOMMERHAUSER et al., 2003).

As infecções causadas pelo *S. aureus* foram caracterizadas pela primeira vez por Alexander Ogston, em 1883. Em 1884, a bactéria foi taxonomizada por Rosenbauch e, em 1890, isolada de glândulas bovinas inflamadas (DIVERS; PEEK, 2008).

As características de patogenicidade do *S. aureus* facilitam sua disseminação entre os animais do rebanho (FROST; WANASINGHE; WOOLCOCK, 1977), mas não aumentam expressivamente a contagem celular do leite de tanque quando comparadas às mastites de etiologia ambiental (JAYARAO et al., 2004). Dessa forma, manifestam-se nos animais predominantemente sob a forma subclínica, e com prevalência superior à observada dos casos clínicos, induzindo ao pensamento errôneo de que as infecções causadas por este patógeno tenham impactos administráveis sobre a produção dos animais e a qualidade do leite (PYÖRÄLÄ, 2002).

2.1.1 Epidemiologia da mastite por *Staphylococcus aureus*

Prevalência e importância da doença

Mundialmente, o *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais comumente relacionado aos casos de mastite contagiosa bovina (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Diversos estudos relataram grande número de planteis em que o microrganismo estava presente (WILSON; RICHARDS, 1980; OLIVER; MITCHELL, 1984; GONZALEZ et al., 1990; DAVID; RUBEN; HELENA, 1997; PITKÄLÄ et al., 2004); e a elevada prevalência de infecções intramamárias devidas a ele dentro dos rebanhos (SMITH; HOGAN, 2000). No Brasil, estudos apontaram grande prevalência do agente nos rebanhos leiteiros: Ferreiro et al. (1985) relataram a presença do *S. aureus* em 17% dos rebanhos estudados no Estado do Rio Grande do Sul; Langoni, Pinto e Domingues (1991) isolaram o *S. aureus* em 35,53% das 702 amostras de leite procedentes de vacas com mastite subclínica no Estado de São Paulo; e Brito et al. (1999) encontraram o patógeno em 98% dos rebanhos estudados no Estado de Minas Gerais.

Estudos de impacto econômico da mastite sobre a cadeia leiteira sugerem que as perdas verificadas em rebanhos acometidos pelo *S. aureus* podem superar as perdas médias de rebanhos em que o patógeno não é isolado (GRÖHN et al., 2004; SWINKELS; HOGVEEN; ZADOKS, 2005; REKSEN et al., 2006; HALASA et al., 2007; MCDOUGALL et al., 2007; HUIJPS; LAM; HOGVEEN, 2008; NIELSEN, 2009). Apesar da maior susceptibilidade das vacas multíparas ao *S. aureus* (GRÖHN et al., 2004; MCDOUGALL et al., 2007), a doença ocasionada pelo patógeno é mais prevalente entre os animais mais jovens (PANKEY; DRECHSLER; WILDMAN, 1991; NICKERSON; OWENS; BODDIE, 1995; WAAGE et al., 1999; FOX, 2009), e determina as maiores perdas de produção entre as primíparas infectadas (PIEPERS et al., 2009).

Do ponto de vista de saúde pública, a bactéria está associada à intoxicações alimentares pelo consumo de leite pasteurizado, uma vez que as enterotoxinas produzidas por determinadas cepas de *S. aureus* não são inativadas pelo processamento térmico (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; JØRGENSEN et al., 2005). E o primeiro caso de transmissão direta, sem direção definida, de *S. aureus* resistente à metilicina, entre vacas com mastite subclínica e o ser humano, foi recentemente documentado (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007), evidenciando o potencial zoonótico deste patógeno.

Reservatório e transmissão do patógeno

O *S. aureus* está viavelmente presente em locais comuns ao ambiente da vaca leiteira, como na cama, no solo e na poeira, e em seu alimento (BLOWEY; EDMONDSON, 2000). Entretanto, devido à pequena diversidade de cepas capazes de causar infecção intramamária o *S. aureus* causador da mastite bovina é classificado como microrganismo contagioso (BYSTRONÍ et al., 2009), o que reforça a sugestão de que a glândula mamária da vaca infectada seja o reservatório primário da bactéria (ZECCONI, 2006).

Middleton et al. (2002) observaram aumento da prevalência da infecção por *S. aureus* e maior variabilidade de cepas do patógeno em rebanhos que adquiriram novilhas para reposição em relação aos outros que mantiveram o rebanho fechado, e apontaram que tal categoria animal também representa um importante reservatório do microrganismo, o que se contrapõe ao conceito de que a glândula mamária ainda em desenvolvimento seja menos susceptível à infecção pelo patógeno (ROBERSON et al., 1998).

Como o leite contaminado é considerado a fonte primária do patógeno, o equipamento de ordenha e demais fômites utilizados no manejo de ordenha que contatem os tetos do animal infectado são os principais vetores inanimados para a sua transmissão (SANTOS; FONSECA, 2006); e dentre os animados de maior relevância epidemiológica, as moscas-do-chifre (*Hematobia irritans*) também foram apontadas como importante transmissor de *S. aureus* (OWENS et al., 1998).

Muito embora o microrganismo seja geralmente isolado do canal do teto, interior da glândula ou pele do teto (ROBERSON et al., 1994), o patógeno também é encontrado em outros sítios extramamários, como lesões de tetos, de membros anteriores e de porções do abdome próximas aos tetos e ao úbere (MATOS et al., 1991). Estudos biomoleculares evidenciaram maior homologia entre os *S. aureus* isolados de equipamentos de ordenha e as cepas encontradas no leite de animais dos animais, com diferenças expressivas entre as cepas presentes no leite mastítico e aquelas obtidas da pele dos tetos (ZADOKS et al., 2002), e homologias ocasionais (JØRGENSEN et al., 2005) entre as cepas isoladas das mãos dos ordenhadores e do leite de animais com infecção.

Manifestação da doença

Na glândula, o patógeno causa infecções que podem se apresentar desde a forma subclínica à peraguda gangrenosa, que leva eventualmente o animal à morte (RADOSTITIS et

al., 2000), mas é, de fato, a apresentação subclínica, a de maior impacto das manifestações da doença, pois a única alteração prontamente detectável é o aumento da contagem de células somáticas (CCS) do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). A manifestação ocasiona substituição lenta e gradativa do tecido secretório afetado por tecido fibroso, com consequente aumento da duração da infecção e dificuldade de penetração de antibiótico nos sítios de infecção (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006).

A CCS de amostras compostas do leite de animais infectados pode se manter por certo tempo abaixo do limiar de contagens para a infecção subclínica (200.000 células/mL), dificultando a identificação dos quartos mamários doentes, transmissores do patógeno para os quartos mamários sadios do rebanho (SEARS et al., 1990; SEARS; MCCARTHY, 2003a). A elevada CCS de animais com infecção por *S. aureus* torna, por sua vez, reservado, o prognóstico da doença (ZADOKS et al., 2001).

A virulência do *S. aureus* (SUTRA; POUTREL, 1994) e fatores ligados ao hospedeiro, como a eficiência de montagem da resposta imune frente à infecção (BURTON; ERSKINE, 2003), idade da vaca e estágio de lactação (ZADOCKS et al., 2001) são aspectos que determinam a forma e a cronicidade da infecção (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006).

Controle

O Programa dos 5 pontos, desenvolvido pelo *National Institute of Research in Dairying*, na década de 1960, contempla o controle da disseminação de patógenos contagiosos (SANTOS; FONSECA, 2006). O programa se baseia na implantação adequada e execução sistemática das seguintes medidas: adequado funcionamento do equipamento de ordenha; correto manejo de ordenha (com a desinfecção de tetos pós-ordenha); tratamento imediato de todos os casos clínicos; e tratamento da vaca seca, com a segregação ou descarte de animais com mastite crônica (SANTOS; FONSECA, 2006). Entretanto, estudos sobre o efeito da adoção isolada do Programa dos 5 pontos para controlar a disseminação do *S. aureus* demonstram resultados pouco promissores, uma vez que algumas medidas apregoadas pelo programa apresentam efeito limitado sobre o patógeno quando comparado ao controle do *Streptococcus agalactiae* (ZADOKS; FITZPATRICK, 2009). A segregação das vacas infectadas pelo *S. aureus* (FOX et al., 1991), e o descarte dos animais cronicamente infectados são ainda as medidas de maior efetividade para o controle da disseminação do patógeno entre os animais do rebanho, e que, no entanto, são as menos frequentemente

adotadas pelos produtores de leite que possuem grande prevalência do microrganismo em seus rebanhos (ZECCONI, 2006), uma vez que a reposição de animais é ainda relatada como o fator determinante dos maiores custos na produção leiteira mundial (SANTOS; FONSECA, 2006).

Atualmente, a expansão do Programa dos 5 pontos para conter a disseminação e aumentar as probabilidades de erradicação do *S. aureus* tem se baseado em medidas adicionais que aumentam a resistência intrínseca do hospedeiro por meio da nutrição (SALMAN et al., 2009), vacinação (SHKRETA et al., 2004; DENIS et al., 2009), melhoramento genético dos animais (DETILLEUX, 2009), implementação de produtos e procedimentos no pós-ordenha (BLOWEY; EDMONDSON, 2010), e a desinfecção de teteiras entre ordenhas (ZECCONI, 2006). Entretanto, tais medidas ainda não garantem a prevenção da disseminação do *S. aureus*, e, portanto, a disponibilidade de procedimentos diagnósticos rápidos e sensíveis podem auxiliar na implementação dos programas de controle e erradicação do patógeno nos rebanhos (ZECCONI, 2006).

2.1.2 Mastite por *S. aureus* e CCS

A despeito da diversidade de fatores que concorrem para o aumento da contagem de células somáticas no leite bovino, creditam-se às mastites causadas pelos patógenos maiores, que incluem o *S. aureus* e o *S. agalactiae*, os aumentos mais significativos da CCS (HARMON, 1994).

Assim, em função da forte correlação entre inflamação e a presença de infecção no quarto afetado (DJABRI et al., 2002), a contagem de células somáticas é a medida mais usada para mensurar a saúde da glândula mamária nos dias atuais (SCHUKKEN et al., 2003). E ainda que nem todas as vacas com mastite por estafilococos coagulase-positiva apresentem aumentos evidentes da CCS (HOBLET; BAILEY; PRITCHARD, 1988), se aceita o fato que, de forma geral, qualquer aumento na contagem de células somáticas está associado à infecções intramamárias (FOX; GAY, 1993).

Em infecções experimentais de glândulas sadias por *S. aureus*, há relatos de aumentos da CCS logo às 3 primeiras horas pós inoculação do agente, atingindo contagens na ordem de 10^6 células/mL, logo às primeiras 48 horas (SUTRA; POUTREL, 1994) sem, entretanto, a observação de um padrão na variação da CCS em função da presença do patógeno (SHOSHANI et al., 2000). Tais flutuações na CCS observadas durante a infecção subclínica

pelo *S. aureus* podem ser o reflexo de um equilíbrio que se estabelece entre a taxa de multiplicação do patógeno na glândula e o recrutamento de mecanismos celulares de defesa do animal, possivelmente em função da baixa eficiência fagocítica dos polimorfonucleados sobre o microrganismo, diante de moléculas complexas, como a caseína e as gorduras do leite (RUSSELL; BROOKER; REITER, 1977); a baixa eficiência na opsonização do *S. aureus* (GUIDRY et al., 1991); a alteração do mecanismo de apoptose dos leucócitos modulada por fatores de virulência do *S. aureus* (SLADEK et al., 2005); ou mesmo a presença de fatores antifagocíticos desenvolvidas pelo patógeno (ZECCONI et al., 2005).

Assim, como resultado da diversidade de fatores que contribuem para a patogenia da doença, poucos são os relatos que observaram correlação bem definida entre CCS e a presença da infecção.

2.1.3 Mastite por *S. aureus* e alterações da composição do leite

A inflamação intramamária *per se* determina alterações da composição do leite, seja pela redução da síntese dos componentes lácteos do tecido secretor mamário, ou pelo influxo de componentes sanguíneos decorrente do aumento da permeabilidade vascular, resultantes da inflamação da glândula (SANTOS; FONSECA, 2006). Contudo, o agente bacteriano causador da mastite pode afetar as características de composição do leite, seja pela ação extracelular de suas enzimas, já que diferentes espécies bacterianas causam diferentes danos físico-químicos ao leite (ANDERSON, 1982; LEIGH; LINCOLN, 1997); ou, pelos mecanismos enzimáticos desencadeados pela resposta imune inata do animal frente ao patógeno em questão (AZZARA; DIMICK, 1985; COULON et al., 2002; LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003), mesmo que com CCS similares.

Os efeitos atribuídos especificamente ao patógeno causador da mastite sobre a composição do leite foram documentados (WHEELLOCK et al., 1966; MILLER et al., 1984; HOLDAWAY; HOLMES; STEFFERT, 1996), mas somente pesquisas mais recentes enumeraram alterações na composição proteica (URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999; COULON et al., 2002; LEITNER et al., 2006; ZAFALON et al., 2008) do leite ocasionadas pela infecção pelo *S. aureus*, e apenas uma (LEITNER et al., 2006) se propôs a estudar seu efeito sobre a gordura, sem, no entanto, relatar diferença entre o leite de glândulas sadias e infectadas pelo patógeno.

2.1.4 Contagem de *S. aureus* durante a infecção intramamária

Até o momento, os estudos que buscaram conhecer o padrão de eliminação do *S. aureus* de quartos mamários infectados avaliaram o número mais adequado de amostras de leite necessárias para a obtenção da maior sensibilidade diagnóstica da metodologia laboratorial apregoada pelo *National Mastitis Council* para a detecção do patógeno (SEARS; MCCARTHY, 2003a), mas não buscaram estabelecer uma relação entre as contagens da bactéria e as variações quantitativas de células somáticas, de produção de leite ou dos componentes lácteos, tal qual se propõe o presente estudo.

2.1.5 Mastite por *S. aureus* e o impacto sobre a produção de leite pelo quarto mamário afetado

Resultados obtidos em estudos que buscaram mensurar a diminuição de produtividade de leite associada às infecções intramamárias pelo *S. aureus* variam por considerarem diferentes fatores em seus modelos. Por exemplo, Bartlett et al. (1991) observaram redução de 83 kg de leite entre os animais afetados clinicamente por estafilococos coagulase positivo durante o período de 60 dias em lactação. Esta perda associada ao patógeno foi, entretanto, menor que aquelas observadas entre os animais acometidos por estreptococos não-*agalactiae* (146 kg), coliformes (95 kg) e estafilococos coagulase-negativo (88 kg) durante o mesmo período. Igualmente, Coulon et al. (2002) não observaram perdas significativas da produção diária de leite ocasionada pela infecção clínica por *S. aureus* (1,6 kg/dia, durante 5 dias de infecção).

2.1.6 Diagnóstico da mastite por *S. aureus* por meio de microbiologia convencional

O *S. aureus* é uma bactéria pertencente à família *Micrococcaceae*, do gênero *Staphylococcus*. Catalase-positivo, podendo ser oxidase-negativo, o organismo é anaeróbio facultativo, e pode ser diferenciado das outras espécies de estafilococos por produzir colônias

de pigmentação dourada, enzima coagulase, e utilizar os açúcares manitol e trealose, com produção de ácido após a fermentação. Em meios de culturas não seletivos, como o caldo simples ou ágar simples, cresce satisfatoriamente sob pH 7 e temperatura de 37°C. Em ágar contendo 5% de sangue ovino desfibrinado, após 24 horas à 37°C, a bactéria se prolifera produzindo colônias de cerca de 1-3mm de diâmetro, convexas, com superfície lisa e bordos circulares, opacas ou brilhantes, e hemólises [incompleta (β), completa e incompleta ($\alpha\beta$), ou zonas hemolisadas difusas (α) ou delimitadas (δ)]. À microscopia, as células apresentam coloração Gram-positiva e formato esférico com diâmetro próximo à 1 μm , que o designam cocos, e que, geralmente estão agrupadas em cachos (*staphyle*, do grego, significa uva) (QUINN et al., 2011).

De acordo com o *National Mastitis Council*, o isolamento do *S. aureus* na amostra de leite é considerado definitivo para o diagnóstico da infecção intramamária pelo patógeno (HOGAN et al., 1999). Entretanto, a intermitência na eliminação do patógeno pela glândula subclínicamente infectada (SEARS et al., 1990), e a presença de substâncias antimicrobianas na amostra de leite podem diminuir a viabilidade da célula bacteriana (TAPONEN et al., 2009), justificando a ausência de crescimento do *S. aureus* no meio de cultura convencional e produzindo resultados falso-negativos. Pelo método, o isolamento do patógeno em uma única amostra da glândula doente apresenta sensibilidade diagnóstica da ordem de 75% (SEARS et al., 1990), e aumenta para 94% e 98%, respectivamente, quando a segunda e a terceira amostras são consecutivamente coletadas da glândula afetada e independentemente analisadas (OLIVER et al., 2004). Ou seja, 25% das infecções por *S. aureus* apresentarão resultado negativo (falso-negativo) quando somente uma amostra do quarto infectado for tomada para realização do exame microbiológico direto (SEARS; MCCARTHY, 2003a).

Uma vez que a tripla amostragem é onerosa e laboriosa, na maioria das rotinas para triagem da doença o diagnóstico é realizado tendo como referência o resultado obtido a partir de uma única amostra assepticamente coletada do caso suspeito (SEARS; MCCARTHY, 2003a). Este fato acaba por limitar a capacidade em reconhecer vacas infectadas, e de estabelecer medidas efetivas para o monitoramento e controle da transmissão do patógeno entre os animais do rebanho (DINSMORE, 2002).

2.1.7 Diagnóstico da mastite por *S. aureus* por meio de metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase

Nos últimos anos, diversas metodologias moleculares para uso na Medicina Veterinária foram desenvolvidos (BELÁK; THORÉN, 2001), e com evidente destaque, aquelas que utilizam a reação em cadeia da polimerase com aplicação diagnóstica (MAXWELL; GILLESPIE; OLIVER, 2008; STUDER et al., 2008; KOSKINEN et al., 2009; TAPONEN et al., 2009), epidemiológica (FERREIRA et al., 2006; HUYGENS et al., 2006; ZADOKS; SCHUKKEN, 2006; FONSECA, 2008; REINOSO et al., 2008), e no monitoramento da mastite por *S. aureus* (HAVERI et al., 2005; LUTHJE; SCHWARZ, 2006).

A aplicação diagnóstica da metodologia fundamenta-se na detecção da presença do organismo por meio da replicação *in vitro* de parte do seu DNA, que é a amplificação propriamente dita e, a subsequente visualização do resultado (LOEFFELHOLZ; DENG, 2006). Dessa forma, as diversas variações da metodologia de PCR são potencialmente aplicáveis quando o diagnóstico do *S. aureus* pela metodologia convencional é limitado por culturas sem o crescimento do patógeno (TAPONEN et al., 2009), uma vez que o método independe da viabilidade da célula bacteriana.

A primeira aplicação da técnica de PCR com função diagnóstica da mastite inaugurou a possibilidade de detecção de patógenos causadores da infecção diretamente da amostra de leite da vaca (TILSALA-TIMISJÄRVI; ALATOSSAVA, 1997). O método, entretanto, utilizava-se da sequência gênica codificadora da subunidade do RNA ribossômico bacteriano 16S-23S (FORSMAN; TILSALA-TIMISJÄRVI; ALATOSSAVA, 1997) como alvo da amplificação, o que o dotava de elevada sensibilidade diagnóstica, mas reduzida especificidade, pois amplificava indistintamente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*.

Em seguida, o desenvolvimento de técnicas resultantes de modificações da PCR em diversos campos da ciência permitiu o aumento da sensibilidade e especificidade da metodologia com aplicação diagnóstica para a mastite estafilocócica. Resultante dessas modificações cita-se a técnica qualitativa de PCR multiplex, que se baseia numa reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências alvo numa mesma amostra, a partir de *primers* randômicos que amplificam regiões repetitivas do DNA genômico

(LOEFFELHOLZ; DENG, 2006). Utilizando esta variação da técnica, Phuektes et al. (2001) e Riffon et al. (2001) verificaram elevada sensibilidade da metodologia em detectar *S. aureus* a partir de amostras de leite, em detrimento do resultado negativo obtido pelo diagnóstico microbiológico convencional.

2.2 PCR EM TEMPO REAL NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

A técnica de PCR em tempo real, ou qPCR (*quantitative PCR*), permite que a amplificação do gene alvo e sua detecção ocorram simultaneamente, num sistema fechado, a partir de um termociclador acoplado à um sistema de monitoramento de emissão da fluorescência, para quantificar o número de cópias de DNA que se formam durante os ciclos de amplificação (HIGUCHI et al., 1993).

Dessa forma, a metodologia aplica-se como meio diagnóstico para a detecção do patógeno (KOSKINEN et al., 2009), e potencialmente para a quantificação simultânea do *S. aureus* (STUDER et al., 2008), permitindo o entendimento entre as diferenças de virulência, patogenicidade e de taxas de cura que são observadas entre animais com a infecção intramamária ocasionada pela bactéria (ZADOKS; SCHUKKEN, 2006).

Uma das vantagens desse sistema fechado de monitoramento da fluorescência é o fato de não haver necessidade de manipulação pós-amplificação da amostra, que diminui não só o tempo consumido para obtenção do resultado diagnóstico, mas também as chances de contaminação com material amplificado entre amostras (MACKAY, 2004). Além disso, o custo-benefício para a implantação da metodologia justifica-se em laboratórios onde se mantém rotina diagnóstica ininterrupta, particularmente aqueles onde se utilizam a metodologia convencional de identificação microbiológica (ESPY et al., 2006).

No tocante à quantificação bacteriana por meio da PCR em tempo real, Graber et al. (2007) verificaram que a metodologia foi capaz de quantificar 10^8 cópias do genoma do *S. aureus*, o que demonstra a robustez do método frente à amostras com elevada carga microbiana comparado à microbiologia convencional. Da mesma forma, a capacidade de quantificação em amostras com baixa contagem de organismos, ou com reduzido número de células viáveis, amplia a vantagem da metodologia em relação aos procedimentos

microbiológicos tradicionais de detecção e isolamento em rotinas diagnósticas (HEIN et al., 2005; GOTO et al., 2007; STUDER et al., 2008).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi de verificar a validade da metodologia quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real como teste diagnóstico para a detecção de microrganismo causador da mastite contagiosa.

Os objetivos específicos foram:

Determinar a sensibilidade e especificidade analíticas, e a repetibilidade do método de qPCR para detectar o *S. aureus* em amostras de leite conservadas com o bronopol, tendo como referência o método microbiológico convencional para o diagnóstico da mastite por *S. aureus*.

Determinar a sensibilidade e especificidade diagnósticas do método de qPCR para detectar o *S. aureus* em amostras de leite oriundas de quartos subclínicamente infectados pelo patógeno, conservadas com o bronopol.

Avaliar a equivalência entre os métodos de qPCR e as metodologias de referência utilizadas para quantificar o *S. aureus* e as células somáticas em amostras de leite conservadas com bronopol.

Estimar a correlação entre CCS e a contagem de *S. aureus* em amostras de leite de quartos mamários.

Verificar o efeito da presença e da quantidade de células de *S. aureus* sobre a produção e composição do leite de quartos mamários subclínicamente afetados pelo microrganismo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE QUANTIFICAÇÃO

4.1.1 Preparo dos padrões para quantificação

a. Cepa padrão

Foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), mantida sob -20°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Merck, Darmstadt, Alemanha) com Glicerol à 50% em concentração de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (CAMEOTRA, 2007), no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, para a contaminação artificial do leite cru bovino.

b. Células somáticas bovinas

Foram obtidos 1000 mL de leite, por ordenha manual e completa, com contagem de células somáticas alta (9×10^6 CS/mL), de um quarto mamário com mastite subclínica (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971; RADOSTITIS et al., 2000), de uma vaca multípara da raça Holandesa, do rebanho da PCAPS-USP, Pirassununga-SP, para a inoculação de células somáticas no leite cru bovino.

c. Leite cru bovino utilizado para as inoculações

Foi utilizado o leite cru bovino para o preparo dos padrões para quantificação do *S. aureus* e da célula somática bovina, como meio de diluição para inoculação para estas células. Para tanto, 1000 mL de leite obtidos de ordenha manual, asséptica e completa, de um quarto mamário, subclínica e clinicamente sadio (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971; RADOSTITIS et al., 2000), de uma vaca primípara da raça Holandesa, do rebanho da PCAPS-USP (Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, SP), foram utilizados para o preparo dos padrões para quantificação. O leite obtido apresentou resultado negativo para a presença de *Staphylococcus aureus* por método microbiológico convencional (OLIVER et al., 2004) e pela metodologia de PCR qualitativo

(GRABER et al., 2007); ausência de inibidores de crescimento e características físico-químicas alinhadas com os parâmetros apregoados para o leite cru bovino (BRASIL, 2002); contagem bacteriana total <2.000 UFC/mL; e contagem de células somáticas <200.000 CS/mL.

d. Contaminação artificial do leite cru bovino com *S. aureus* ATCC 29213

Da solução contendo a cepa padrão, 100 μ L foram inoculados em 6 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 15 h. Após confirmação do crescimento por turvação do meio, os 6 mL de caldo BHI contendo o microrganismo foram inoculados em 54 mL do leite cru bovino, com baixa carga bacteriana (<1.000 UFC/mL). Após completa homogeneização, foram tomados 6 mL do volume total para inoculação em 54 mL do leite cru estéril, de modo a obter, sucessivamente, 10 diluições seriadas do inóculo em leite cru bovino na proporção de 1:9.

De cada uma das diluições, foram feitas 3 alíquotas para a quantificação de *S. aureus*: duas alíquotas foram utilizadas, respectivamente, como referência de contagem do microrganismo, por citometria de fluxo (método de rotina para contagem bacteriana) e contagem em placas (método referência); e a terceira foi utilizada para a quantificação pelo método de PCR em tempo real (método de qPCR).

e. Inoculação de células somáticas bovinas no leite cru

De modo à obter contagens de células somáticas que abrangessem os limiares fisiológico e patológico mensuráveis pelo método de rotina para determinação da CCS, volumes de leite cru bovino com alta (8480×10^3 CS/mL) e baixa contagens de células somáticas (25×10^3 CS/mL) foram combinados. De cada uma das amostras de referência obtidas das combinações (Tabela 1), duas alíquotas foram feitas para a quantificação das células: a primeira foi utilizada como referência para a quantificação de células somáticas por contagem eletrônica (método de rotina para contagem de células somáticas), e a segunda foi utilizada para a quantificação pelo método de qPCR e respectiva construção de curva padrão.

Tabela 1 - Contagem final de células somáticas das amostras de referência para CCS, obtidas a partir da combinação de volumes de leite contendo alta (8480×10^3 CS/mL) e baixa contagens de células somáticas (25×10^3 CS/mL), utilizadas para a quantificação de células somáticas por contagem eletrônica e pelo método de qPCR

Amostra de referência	Alta CCS (mL)	Baixa CCS (mL)	CCS obtida (CS/mL)
1	0	100	25×10^3
2	1	99	371×10^3
3	3	97	897×10^3
4	5	95	1550×10^3
5	7	93	2080×10^3
6	9	91	2560×10^3
7	10	90	2800×10^3
8	20	80	5660×10^3
9	30	70	8480×10^3

f. Conservação das alíquotas

As alíquotas destinadas ao método de qPCR e contagem eletrônica de células somáticas foram adicionadas de uma pastilha contendo os conservantes bactericida e antifúngico, bronopol e natamicina, respectivamente, nas concentrações de 8 mg e 0,30 mg, respectivamente, para cada 50 mL de leite (Microtabs II, D & F Control Systems, Inc., Norwood, MA, EUA). As alíquotas destinadas à enumeração do microrganismo por citometria de fluxo foram adicionadas do conservante bacteriostático azidiol (0,15% de cloranfenicol e 3,6% de azida sódica), na concentração de 160 μ L da solução para cada 50 mL de leite (CASSOLI et al., 2010). Alíquotas utilizadas nos procedimentos de microbiologia convencional não foram submetidas a qualquer processo de conservação, e foram imediatamente analisadas pela metodologia à que se destinava.

4.1.2 Metodologias para a construção das curvas de quantificação

a. Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) de uma das alíquotas foi realizada por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico, definido como método de rotina para determinação da CCS (International Organization for Standardization & International Dairy Federation, International Standard - ISO 13366-2:2006; IDF 148-2: 2006),

utilizando-se equipamento Somacount 300® (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN, EUA), no Laboratório de Fisiologia da Lactação, do Departamento de Produção Animal da ESALQ – USP (Piracicaba, SP), e os resultados expressos em células somáticas por mililitro de leite (CS/mL).

A segunda alíquota foi submetida à quantificação do ácido nucleico bovino pelo método de qPCR, descrito no item 4.1.2.1, e os resultados expressos em \log_{10} CCS/mL.

b. Enumeração do *S. aureus* ATCC 29213

A determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. aureus* em amostras sem o azidiol foi realizada a partir do plaqueamento do leite no 3M Petrifilm® Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis, MN, EUA), conforme orientações do fabricante, servindo como método para a referência de enumeração de células viáveis de *S. aureus* ATCC 29213 (SILBERNAGEL et al., 2003).

Uma alíquota foi utilizada para a quantificação do DNA do *S. aureus* ATCC 29213 por qPCR, conforme descrição no item 4.1.2.1 à seguir. As diluições das amostras com resultado de enumeração do *S. aureus* ATCC 29213 igual à zero no 3M Petrifilm® Staph Express Count Plate, foram tomadas para a determinação da sensibilidade analítica do método de qPCR.

A contagem total de microrganismos a partir da terceira alíquota, conservada com azidiol, foi realizada por citometria de fluxo, servindo como método de rotina para determinação da contagem bacteriana total (International Organization for Standardization & International Dairy Federation, International Standard - ISO 21187:2004; IDF 196:2004), utilizando-se equipamento BactoScan® (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca), no Laboratório de Fisiologia da Lactação, do Departamento de Produção Animal da ESALQ – USP (Piracicaba, SP). Resumidamente, o método consiste na adição de brometo de etídio à amostra de leite, para ligação inespecífica ao DNA bacteriano. A amostra é, então, injetada em um capilar acoplado a um sistema óptico, que capta a fluorescência emitida pelo DNA bacteriano. Dessa forma, o número total de bactérias numa amostra é determinado, e o resultado expresso em unidades bacterianas individuais por mililitro (IBC/mL) (CASSOLI et al., 2010). Neste estudo, esta metodologia foi utilizada exclusivamente para referenciar a razão da diluição seriada do *S. aureus* ATCC 29213 no leite para os métodos de referência e o de qPCR, já que o método de referência baseia-se na enumeração de organismos viáveis presentes na amostra, e o método de qPCR, a estimativa do número total do DNA alvo.

4.1.2.1 Metodologias para detecção e quantificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Método de qPCR)

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

a. Extração do DNA bacteriano e bovino

As amostras de leite foram processadas, em duplicata, utilizando-se o QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Minneapolis, MN EUA), conforme orientação do fabricante. Resumidamente, 20 µl de proteinase K foram adicionados em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, 200 µL de cada amostra de leite, devidamente homogeneizados, foram adicionados à proteinase K (fornecida pelo fabricante), seguidos de 200 µL do tampão de lise AL (fornecido pelo fabricante). Após a homogeneização, a amostra foi incubada por 10 minutos à 95°C. Após esse período, 200 µl de etanol absoluto foram adicionados ao tubo, e o volume total, após agitado em vórtex, foi totalmente transferido para o dispositivo de coluna de sílica para centrifugação a $6.000 \times g$ por um minuto. Em seguida, 500 µL de tampão de lavagem AW1 (fornecido pelo fabricante) foram adicionados, e o volume novamente centrifugado a $6.000 \times g$ por um minuto. O procedimento de segunda lavagem foi realizado na sequência, com a adição de 500 µL do tampão de lavagem AW2 (fornecido pelo fabricante), seguido da centrifugação a $20.000 \times g$ durante 3 minutos. Uma segunda centrifugação sob a mesma velocidade foi feita por um minuto. O DNA extraído retido na coluna foi eluído para um microtubo de 1,5 mL pela adição de 100 µL tampão de eluição AE (fornecido pelo fabricante), incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, e centrifugado a $6.000 \times g$ durante um minuto, seguida de uma segunda centrifugação sob as mesmas condições. O DNA eluído foi mantido sob temperatura de -20°C até o momento da análise.

b. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os pares de *primers* utilizados nas reações de detecção e quantificação do *S. aureus*, senso CCTGAAGCAAGTGCATTTACGA e antisenso CTTTAGCCAAGCCTTGACGAACT (GRABER et al., 2007), anelaram à região genômica

codificante da enzima nuclease extracelular termoestável do *S. aureus* (*nuc*), aqui denominado SAU, gerando um fragmento de 166 pb como produto de amplificação.

Servindo como controle positivo do procedimento de extração das amostras e da reação de amplificação, um par de *primers* (senso GCAATACACTACACATCCGACACAA e antisenso GCGTGTATGTATCGGATGATTCAG) foi desenhado a partir do aplicativo PrimerExpress® (Applied Biosystems, Foster, EUA). Estes *primers* amplificaram a região genômica codificante do citocromo mitocondrial B (assim denominado BMCB) (GeneBank accession number V00654), presente nas células somáticas bovinas, gerando como produto de amplificação um fragmento de 98 pb.

Os *primers* foram avaliados pelo programa Primer-BLAST do National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, EUA), disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, para verificação da especificidade de anelamento do *primer* SAU entre as sequências genômicas depositadas de *Staphylococcus aureus*, e entre outras espécies de estafilococos; e do *primer* BMCB entre as sequências genômica de bovídeos depositadas.

c. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação de amplificação *simplex* de cada um dos alvos foi realizada, em duplicata, em equipamento StepOne® (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Cada reação de amplificação foi composta por SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Foster, EUA), 20 pmol dos *primers* senso e antisenso e um microlitro do ácido nucleico. O programa do termociclador foi de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, com um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos. As amplificações foram feitas em placas de reação de 48 poços MicroAmp® (Applied Biosystems, Foster, EUA). Em cada ciclo, a acumulação dos produtos de PCR foi detectada monitorando-se o aumento na fluorescência da ligação de fluoróforo aos fragmentos. Ao fim da amplificação, uma curva de dissociação foi construída na amplitude de 60°C a 95°C, para cada um dos alvos genômicos (*S. aureus* e célula somática bovina) com seus respectivos *primers*, em cada reação de amplificação, de modo que a temperatura média de dissociação encontrada para o *primer* SAU após a otimização da reação diante de seu alvo (gene *nuc* do *S. aureus*) foi de 75,4°C, e para o *primer* BMCB foi de 77,8°C diante do gene do citocromo mitocondrial B da célula bovina.

O resultado final de cada reação de amplificação foi expresso em *threshold cycles* (Ct). Após concluídas as reações de amplificação para a detecção e quantificação do *S. aureus*, foram consideradas qualitativamente “positivas” (anelamento do *primer* ao seu alvo) as amplificações cujo coeficiente de variação entre os Ct das duplicatas fosse inferior à 3% (BUSTIN, 2004); temperatura de dissociação do *primer* SAU na reação igual à $75,4^{\circ}\text{C} \pm \text{DP}$, e amplificação do controle positivo da amostra, a célula somática bovina, com temperatura de dissociação do *primer* BMCB na respectiva reação igual à $77,8^{\circ}\text{C} \pm \text{DP}$. Diferentemente, as amostras com $\text{Ct} > 44$, com coeficiente de variação entre os Ct das duplicatas superior à 3% e amplificação, com temperatura de dissociação do *primer* BMCB na respectiva reação diferente de $77,8^{\circ}\text{C} \pm \text{DP}$ foram qualitativamente classificadas como “negativas”.

4.1.3 Construção das curvas padrão para as quantificações

Para a construção das curvas de quantificação do *S. aureus* e de células somáticas, os dados de quantificação de *S. aureus* ATCC 29213 e células somáticas obtidos foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para minimizar a heterogeneidade das variâncias, e todos procedimentos desta etapa foram conduzidos no programa computacional SAS[®] versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, pelo uso do PROC UNIVARIATE.

a. Contagem de células somáticas

Para determinar a correlação linear entre o Ct (obtido da amplificação do gene BMCB por qPCR) e as CCS em CS/mL (obtida pelo método de rotina para a contagem de células somáticas) utilizou-se o PROC CORR do SAS[®] versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Verificada correlação significativa ($P < 0,05$), calculou-se a equação para a estimativa da CCS, $Y_0 = a_0 + b_0 X_0$, a partir do valor de Ct obtido da amplificação do gene BMCB (Ct_{BMCB}) de uma dada amostra, utilizando-se o PROC REG, em que:

$Y_0 = \log_{10}\text{CCS estimado};$

$a_0 = \text{intercepto};$

$X_0 = \log_{10}\text{Ct}_{\text{BMCB}}$ resultante da amplificação do gene BMCB na amostra analisada;

$b_0 = \text{coeficiente angular estimado para a variável } X_0.$

b. Enumeração do *S. aureus* ATCC 29213

Para tanto, foi determinada a relação linear entre o Ct obtido da amplificação do gene SAU e a contagem de células viáveis de *S. aureus*, determinada pelo método de contagem em placa, por meio do PROC CORR do SAS[®] versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Observada significância do coeficiente de correlação ($P < 0,05$), calculou-se a equação para a estimativa da contagem de *S. aureus*, $Y_1 = a_1 + b_1X_1$, a partir do valor de Ct obtido da amplificação do gene SAU (Ct_{SAU}) de uma dada amostra, utilizando-se o PROC REG, em que:

$Y_1 = \log_{10}$ UFC de *S. aureus* estimado;

$a_1 =$ intercepto;

$X_1 = \log_{10}Ct_{SAU}$ resultante da amplificação do gene SAU na amostra analisada;

$b_1 =$ coeficiente angular estimado para a variável X_1 .

4.2 COLETA DE AMOSTRAS EM FAZENDAS COMERCIAIS

4.2.1 Seleção dos rebanhos e animais para coleta

Foram selecionados 2 rebanhos leiteiros da região de Pirassununga com 30 e 150 animais da raça Holandesa em lactação, respectivamente. Em ambos os rebanhos foi determinada previamente a ocorrência de casos subclínicos de mastite por *S. aureus* (OLIVER et al., 2004). Em ambas as propriedades as ordenhas eram realizadas por sistema mecânico em dupla espinha. As práticas de manejo de ordenha de ambas contemplavam os procedimentos de desinfecção pós-ordenha, mas em nenhuma a linha de ordenha era realizada, de modo que a vaca entrava aleatoriamente, na espinha de ordenha, à própria escolha.

Do rebanho menor foram selecionadas todas as vacas, e do maior, 30 animais foram selecionados aleatoriamente (THRUSFIELD, 2007). Os animais foram selecionados segundo a ordem de parição (primeira à terceira lactação) e entre 39 e 250 dias em lactação. Foram excluídos da seleção animais com sinais clínicos de mastite (RADOSTITIS et al., 2000) ou sob tratamento de qualquer enfermidade, local ou sistêmica.

4.2.2 Coleta e preparo das amostras para análise

Todas as amostras foram tomadas na última ordenha do dia de cada rebanho selecionado. Para a avaliação das variáveis de composição do leite produzido pelo quarto mamário, foi particularmente importante que a amostra fosse tomada após a ordenha completa do mesmo (URECH et al., 1999).

a) Coleta asséptica e individual da porção inicial do leite de cada quarto mamário, por meio de ordenha manual, totalizando quatro amostras de cada vaca selecionada, para o diagnóstico da mastite estafilocócica do quarto mamário amostrado. As amostras foram submetidas às análises por: 1) cultura microbiológica; 2) método de qPCR. Cada amostra foi coletada diretamente em tubo plástico esterilizado de 50 mL, e imediatamente acondicionada em caixa térmica sob temperatura de 5-7°C até o momento da análise; b) Coleta não asséptica e individual de amostra de leite, representativa do leite produzido por cada quarto mamário, totalizando quatro amostras por vaca, por meio de equipamento de ordenha com separação do leite por quarto. Após medição do volume de leite/quarto mamário, foi feita a agitação e coleta de 200 mL, os quais foram armazenados em tubo plástico, acondicionados em caixa térmica sob temperatura de 5-7°C até sua separação em duas alíquotas: a primeira, para determinação das frações proteicas, que foi imediatamente congelada (-20°C) e assim mantida até o momento da análise; e a segunda, com volume de 50 mL, adicionada de bronopol para análise de composição e contagem de células somáticas por citometria de fluxo. Antes da remessa da última alíquota, 1 mL da amostra foi tomado para determinação da CCS por qPCR.

Todas as amostras foram coletadas na última ordenha do dia de cada rebanho selecionado.

4.3 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO DO LEITE

4.3.1 Determinação dos teores de lactose e gordura

Os teores de lactose e gordura foram determinados por absorção infravermelha, utilizando-se equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN, EUA) no

Laboratório de Fisiologia da Lactação, do Departamento de Produção Animal da ESALQ – USP (Piracicaba, SP).

4.3.2 Determinação da composição proteica

Proteína Bruta

As metodologias para análise da composição proteica do leite foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-químicas de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP (Pirassununga, SP).

A determinação do teor de proteína bruta (PB) foi baseada na mensuração da concentração do nitrogênio total (NT) pelo método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists*; método número 33.2.11; 991.20 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2003). Para a expressão do resultado em PB, a concentração de nitrogênio total obtida foi multiplicada pelo fator 6,38.

Proteína Verdadeira

A proteína verdadeira foi precipitada em solução de ácido tricloracético a 12%. Após a precipitação, a fração foi separada por filtração e a concentração de nitrogênio contida no filtrado, o nitrogênio não proteico (NNP), foi determinada pelo método de Kjeldahl. Assim, o teor de proteína verdadeira do leite foi obtido pela subtração do valor de NNP da concentração de NT da amostra (LYNCH; BARBANO; FLEMING, 1998).

Caseína

A caseína foi precipitada em pH=4,6 usando-se solução de ácido acético e, em seguida, adicionado o acetato de sódio para neutralização do pH. Após a precipitação, a fração foi separada por filtração e a concentração de nitrogênio contida no filtrado, o nitrogênio não caseinoso (NNC), determinada pelo método de Kjeldahl. Assim, a concentração de caseína do leite foi obtida pela subtração do valor de NNC da concentração de NT da amostra (LYNCH; BARBANO; FLEMING, 1998).

4.3.3 Contagem de células somáticas

A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria de fluxo, como descrito no item 4.1.2a.

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *S. AUREUS* PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA

O isolamento do patógeno causador de mastite foi realizado de acordo com o *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis* do *National Mastitis Council* (OLIVER et al., 2004). Resumidamente, 0,01 mL da amostra foi plaqueada em ágar sólido contendo 5% de sangue ovino desfibrinado e incubada à temperatura de 37°C, por 24 horas. Após esse período, colônias de cerca de 1-3mm de diâmetro, convexas, com superfície lisa e bordos circulares, opacas ou brilhantes, com hemólise incompleta (β), completa e incompleta ($\alpha\beta$), com zonas difusas de hemólise (α) ou com hemólise delimitadas (δ), foram submetidas à prova da catalase e à análise microscópica sob a coloração de Gram. Células Gram-positivas e de formato esférico com diâmetro próximo à 1 μ m agrupadas em cachos foram presumivelmente classificadas como estafilococos. Para classificar a espécie entre os organismos do gênero, a colônia foi submetida à prova de coagulação do plasma de coelho (coagulase), incubada à temperatura de 37°C, por 24 horas. Os estafilococos coagulase-positivos foram, então, classificados em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* ou *Staphylococcus intermedius* em função do resultado ao exame bioquímico da alantoína.

Para avaliação da especificidade analítica do método de qPCR, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e 5 isolados de estafilococos coagulase-negativa (sem a identificação da espécie) provenientes de leite mastítico foram incubados em BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37°C por 15 h. Dois isolados de estafilococos coagulase-positiva, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, foram igualmente submetidos à incubação preliminar em BHI. Após confirmação do crescimento, por turvação do meio, cada

caldo de cultivo foi separadamente inoculado em leite cru bovino negativo para *Staphylococcus aureus*.

Em seguida, o ácido nucleico de cada inóculo foi extraído e submetido à reação de amplificação por qPCR, conforme protocolo descrito no item 4.1.2.1, tendo também como controle positivo de reação o gene alvo do *primer* BMCB.

Os demais patógenos foram isolados e identificados segundo os procedimentos apregoados pelo mesmo manual (OLIVER et al., 2004).

4.5 CONTAGEM DE *S. AUREUS* PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA

A determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. aureus* presentes na amostra foi realizada a partir do plaqueamento do leite no 3M Petrifilm® Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com orientações do fabricante com modificações (SILBERNAGEL et al., 2003).

4.6 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO *S. AUREUS* PELO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL

A detecção e quantificação do ácido nucleico do *S. aureus* foi realizada por meio do qPCR, descrito no item 4.1.2.1.

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

De modo a remover a heterogeneidade de variâncias, os dados de CCS foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para a análise estatística, e à função antilogarítmica para apresentação dos resultados.

Os dados de gordura e proteína, obtidos em valores relativos (%) ao volume de leite (mL) pela metodologia de análise foram submetidos à análise estatística tal qual foram obtidos.

Para a comparação das variáveis de produção de leite entre os quartos mamários, os dados de produção de leite, obtidos em mililitros (mL), foram convertidos em gramas (JENSEN, 1995) e ajustados para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923). Para compor os dados de produção de leite, os valores relativos (%) de gordura e proteína foram convertidos em gramas (g).

4.7.1 Determinação da sensibilidade e especificidade analíticas e repetibilidade do procedimento diagnóstico por qPCR

Os parâmetros de avaliação da sensibilidade e especificidade analíticas e de repetibilidade foram determinados conforme estabelecido no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* da Organização Internacional de Epizootias (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010).

A sensibilidade analítica do método de qPCR foi avaliada à partir das alíquotas de diluição seriada do *S. aureus* ATCC 29212, utilizadas para a construção da curva padrão de quantificação do microrganismo.

Foram analisadas, em duplicata, por qPCR, desde a alíquota que apresentou o último resultado classificado como TNTC (*too numerous to count*) pelo 3M Petrifilm® Staph Express Count Plate até a alíquota subsequente à contagem nula de UFC/mL de *S. aureus* pelo método de referência. O limite de detecção do qPCR foi, portanto, a menor concentração detectável do *S. aureus* ATCC 29213 em leite.

A especificidade analítica do método proposto foi computado à partir da enumeração de amostras que não apresentaram qualquer amplificação até o 44^o ciclo nas reações com o *primer* SAU, e amplificações válidas nas reações contendo o *primer* BMCB.

A repetibilidade foi acessada por meio da análise da variabilidade intra e interensaios de 5 amostras submetidas à todo protocolo proposto, em duplicata, em dois dias diferentes. Em seguida, foi calculado o coeficiente de variação entre as duplicatas de cada dia para a determinação da variabilidade intra ensaios; e o coeficiente de variação entre os resultados

obtidos para a amostra completamente analisada em dias diferentes, para expressar a variabilidade interensaios.

4.7.2 Análise de concordância entre os métodos

Uma vez que a cultura microbiológica para o diagnóstico da mastite por *S. aureus* a partir de uma única amostra tomada da glândula doente apresenta sensibilidade e especificidade da ordem de 75% e 94%, respectivamente (SEARS et al., 1990), utilizou-se o teste não-paramétrico Kappa para determinação da intensidade de concordância entre os resultados obtidos pelos métodos de referência (cultura microbiológica) e de qPCR, para a presença ou ausência do patógeno (THRUSFIELD, 2007). Para a análise, os dados obtidos por meio do qPCR foram dicotomizadas em categorias e registrados como “presença” ou “ausência” do patógeno, independentemente da média do Ct de amplificação obtido da duplicata, e desde que mantidos os parâmetros de controle de qualidade da reação de qPCR entre as duplicatas. Para a determinação do coeficiente Kappa, utilizou-se o EPIDAT[®] versão 3.1 (Programa para Análise Epidemiológica de Dados Tabulados, da Organização Panamericana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Santiago de Compostela, A Coruña, Espanha), considerando 2 métodos de observação (cultura microbiológica para isolamento do *S. aureus* vs. qPCR para detecção do *S. aureus*), 2 categorias (presença ou ausência do *S. aureus*), 60 amostras analisadas por ambas metodologias e nível de confiança de 95%. Para a interpretação do coeficiente de concordância no caso de rejeição da hipótese de nulidade (Kappa = 0) e, portanto, a indicação de concordância significativa ($P < 0,001$), foram utilizados os parâmetros definidos por Bland e Altman (BLAND; ALTMAN, 2010).

4.7.3 Análise da equivalência entre os métodos de quantificação

Para avaliar a concordância entre o método de qPCR para a quantificação de *S. aureus* e de células somáticas em amostras de leite, e os métodos de referência para as referidas células, utilizou-se o teste não-paramétrico das diferenças de Bland-Altman (BLAND;

ALTMAN, 2010). Assim, a hipótese nula, testada pela estatística t , foi a de equivalência entre os métodos, e portanto, a de não diferença significativa que, do ponto de vista estatístico, significou que o *Bias* ou a diferença média observada entre os dados obtidos por ambas metodologias (referência e qPCR), foi igual à zero. Contrariamente, um valor P significativo implicou na aceitação da hipótese alternativa (H_a : métodos não são equivalentes), e o *Bias* observado foi diferente de zero. Os limites de concordância aceitáveis entre os métodos de referência e de qPCR foram definidos tendo como os valores limítrofes do intervalo de confiança de 95% das diferenças entre as duas metodologias numa distribuição t , com $n - 1$ graus de liberdade (43 observações, aos pares, para *S. aureus*; 15 observações, aos pares, para células somáticas), ou seja, t (IC95%) \pm erro padrão. A análise de Bland-Altman foi realizada por meio do pacote de análise estatística Analyse-it[®] (Analyse-it Software Ltd., Leeds, West Yorkshire, Reino Unido) para Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation Ltd., Redmond, Washington, EUA).

4.7.4 Identificação do efeito da infecção subclínica por *S. aureus* sobre a composição e produção do leite

Para identificar os efeitos da mastite subclínica por *S. aureus* sobre a composição e produção de leite por quarto mamário, foram consideradas *S. aureus* positivas as glândulas em que foi detectado o *S. aureus* pelo qPCR; e *S. aureus* negativas aquelas em que o patógeno não foi detectado pelo qPCR. Quartos mamários dos quais foram isolados patógenos menores (*Corynebacterium* sp., estafilococos coagulase negativos) e com CCS ≤ 250.000 cels./mL foram classificados *S. aureus* negativos e foram considerados na análise estatística. Quartos mamários dos quais foram isoladas as espécies *Staphylococcus hyicus* ou *Staphylococcus intermedius* e seus equivalentes contralaterais foram excluídos da análise. Animais que apresentaram mastite clínica em qualquer um dos quartos foram excluídos da análise.

A análise de variância dos quadrados mínimos das médias de cada variável foi realizada num delineamento em parcelas subdivididas em faixas (*strip-plot*), em que os tetos anteriores ou posteriores foram separados em metades (anterior ou posterior), de modo que as glândulas contralaterais esquerda e direita foram comparadas dentro de uma mesma metade, dentro de uma mesma vaca, utilizando-se o seguinte modelo misto no PROC MIXED do SAS[®] versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA):

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

onde Y é a variável dependente em estudo; μ é a média dos quadrados mínimos da variável em questão; Tratamento e Metade são os fatores fixos de variação, onde: Tratamento é a presença ou não da mastite subclínica pelo *S. aureus* no teto (*S. aureus* negativo ou *S. aureus* positivo); e a Metade são os tetos contralaterais anteriores ou posteriores, dentro de uma mesma vaca; Tratamento*Metade é a interação entre os fatores fixos de variação; Vaca é o fator de variação aleatório; e e é o erro aleatório atribuído aos fatores de variação.

4.7.5 Estimativa das correlações

Para estimar o grau de relação entre as contagens de *S. aureus*, a CCS, produção e composição do leite produzido pelo quarto mamário afetado, foi utilizado o coeficiente de correlação produto-momento de Pearson. Para tanto, foram consideradas as contagens, determinada e estimada do microrganismo, obtidas respectivamente pelos métodos de referência e de qPCR, como variável independente, e as variáveis de composição (lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira, caseína e CCS) e produção (produção de leite, em mililitro e em grama, produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, gordura e proteína, em quilograma), como variáveis dependentes.

De modo a remover a heterogeneidade de variâncias, os dados das variáveis quantitativas, as contagens de *S. aureus* (obtidas pelos métodos de qPCR e de referência) e a CCS, foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para a análise estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO

a. Contagem de células somáticas

As alíquotas de leite com contagens crescentes de células somáticas (25.000 à $8,4 \times 10^6$ CS/mL) obtidas pelo método de rotina, foram utilizadas para a construção da curva padrão para quantificação da CCS bovina pelo método de qPCR. A faixa de variação obtida permitiu a abrangência de contagens inferiores aos limiares fisiológicos de referência para a glândula mamária bovina (<200.000 CS/mL) (SCHUKKEN et al., 2003), até valores próximos ao limite de quantificação pela metodologia de rotina ($9,9 \times 10^6$ CS/mL). A correlação entre os dados de contagem de células somáticas bovinas determinados pelos métodos de rotina e de qPCR para a quantificação de células somáticas apresentou coeficiente $r = -0,978$ ($P < 0,001$). A equação para a estimativa da CCS de uma dada amostra, em CS/mL, a partir da amplificação do gene BMCB bovino pelo qPCR é $\log_{10} \text{CCS} = 49,3 - 34,0 \log_{10} \text{Ct}_{\text{BMCB}}$, está representada na figura 1.

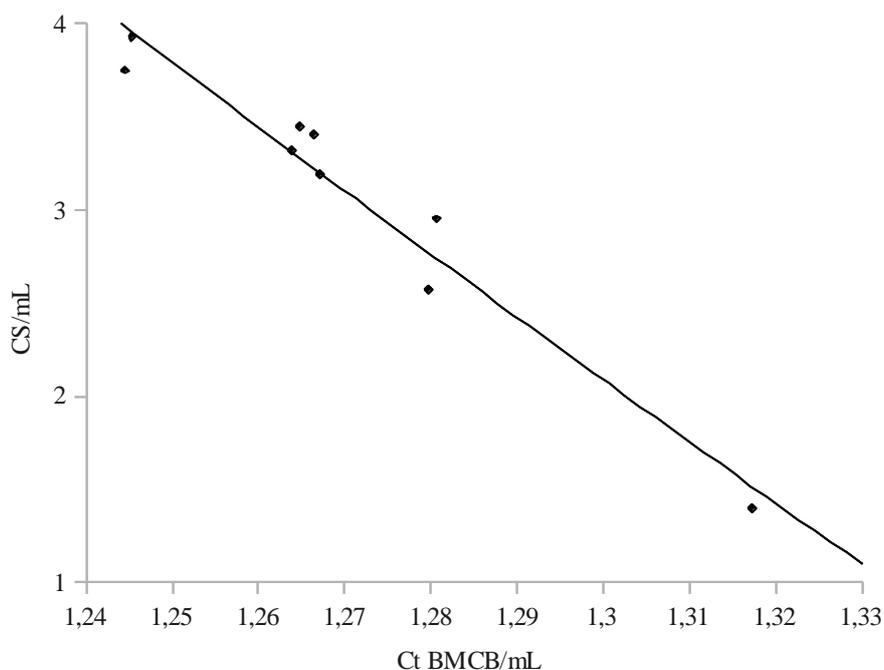


Figura 1 - Correlação entre as contagens de células somáticas bovinas obtidas por citometria de fluxo (CS/mL) e por qPCR (Ct BMCB/mL), de nove contagens crescentes de células somáticas em leite, utilizadas para a construção da curva padrão para a quantificação por qPCR. Os dados (CCS e Ct BMCB) estão expressos em escala logarítmica de base 10

b. Enumeração do *S. aureus* ATCC 29213

Foram observadas correlações fortes e altamente significativas entre as razões de diluição seriada do *S. aureus* ATCC 29213 no leite, entre os métodos de contagem em placas e o de rotina ($r = 0,994$, $P < 0,001$), e entre os métodos de qPCR e o de rotina ($r = - 0,997$, $P < 0,001$), permitindo a construção da curva para quantificação do *S. aureus* em leite. Os resultados de UFC/mL das dez diluições seriadas de *S. aureus* ATCC 29213 em leite, obtidas pelo método de referência utilizado para a construção da curva padrão para quantificar o microrganismo por meio do qPCR variaram de 300 UFC/mL à $9,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Dessa maneira, uma vez determinada a correlação entre os dados de UFC de *S. aureus* do ATCC 29213 pela contagem em placas e os dados de Ct pela amplificação do *S. aureus* do ATCC 29213, por qPCR (Figura 2), foi estabelecida a equação de regressão linear para estimar a UFC/mL de *S. aureus* em leite a partir do método de qPCR.

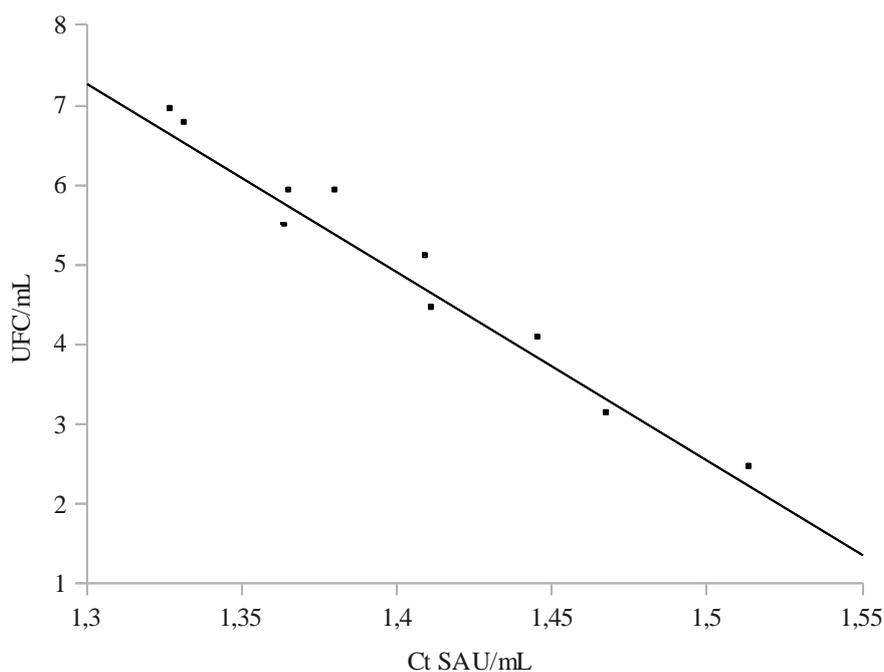


Figura 2 - Correlação ($r = - 0,989$; $P < 0,001$) entre os resultados de quantificação do *S. aureus* ATCC 29213 obtidos pelo método de referência (UFC/mL), contagem em placas pelo 3M Petrifilm® Staph Express Count Plate e por qPCR (Ct SAU/mL), de dez diluições seriadas do organismo em leite, para a construção da curva padrão. Os dados (UFC e Ct SAU) estão expressos em escala logarítmica de base 10. A equação para a estimativa da UFC de *S. aureus*, em UFC/mL, a partir da amplificação do gene SAU de *S. aureus* pelo qPCR é $\log_{10}UFC = 37,86 - 23,54 \log_{10}CtSAU$

5.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICAS, E DA REPETIBILIDADE DO MÉTODO DE QPCR PARA A DETECÇÃO DE *S. AUREUS* EM AMOSTRAS DE LEITE CONSERVADAS COM BRONOPOL

Segundo a Organização Internacional de Epizootias, a sensibilidade analítica ou o limite de detecção de um patógeno por um dado método diagnóstico é definida como sendo a menor quantidade do agente infeccioso (o que pode ser representado pelo número de cópias de seu genoma, no caso de métodos diagnósticos biomoleculares) pelo método em questão, que se possa detectar e distinguir-se de um resultado negativo de fato. Portanto, para determinar a sensibilidade analítica de um teste diagnóstico, utiliza-se a diluição a tal ponto que o método não seja capaz de detectar o alvo em questão em mais de 5% das repetições dentro de um solvente que tenha as mesmas propriedades da matriz do analito (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010). Neste estudo, a partir da análise da série de diluições 1:10 do inóculo de *S. aureus* ATCC 29213 em leite cru, em fase log, os resultados obtidos pelo ensaio (inóculo do *S. aureus* em leite, protocolo de extração utilizado e a amplificação por qPCR com subsequente quantificação do fluoróforo ligado ao produto de amplificação) foram consistentes desde o valor de 10 UFC/mL até $4,2 \times 10^6$ UFC/mL de leite (Figura 3: Curvas de amplificação com maior e menor número de ciclos, Ct 36,70 e Ct 21,21, respectivamente), estimados pela regressão linear $\log_{10}\text{UFC} = 37,86 - 23,54 \log_{10}\text{Ct}_{\text{SAU}}$. A sensibilidade analítica do presente protocolo apresentou capacidade de detecção mais abrangente que os obtidos por Hein et al. (2005), $2,3 \times 10^7$ à 7×10^1 UFC/mL, e Graber et al. (2007), que se situou entre $1,15 \times 10^6$ e $1,15 \times 10^3$ UFC/mL. Ambos (HEIN et al., 2005; GRABER et al., 2007) também utilizaram o gene *nuc* como alvo para a detecção do *S. aureus*, a despeito dos protocolos quantitativos utilizados pelos estudos citados terem sido desenhados com base de detecção sonda-específica (Sistema TaqMan®, Applied Biosystems, Foster, EUA), direcionada para o supracitado alvo, o que aumenta a especificidade diagnóstica do método, mas pode determinar o decréscimo relativo da sensibilidade frente à polimorfismos genéticos discretos do alvo (BUSTIN, 2004). Estudos que utilizaram o sistema SYBR Green I como fluoróforo para a detecção e quantificação do *S. aureus* em queijos por qPCR reportaram limites de detecção de 60 cópias do gene *nuc* por microlitro das diluições de *S. aureus* DSM 1104, sem comprometimento da eficiência de amplificação e geração de produtos inespecíficos de PCR (HEIN et al., 2001).

Estudos pioneiros que buscaram detectar o *S. aureus* por *multiplex* qPCR a partir de amostras de leite provenientes de animais com mastite (GILLESPIE; OLIVER, 2005), utilizaram-se de sistema de detecção sonda-específico tendo como alvo gênico outro que o do presente estudo, o gene codificador da resistência à meticilina do patógeno (MARTINEAU et al., 1998), reportaram sensibilidade de detecção de 10^0 UFC/mL do *S. aureus* em leite, mas necessitaram submeter as amostras à uma etapa de enriquecimento de 18 horas à 37°C previamente ao procedimento biomolecular.

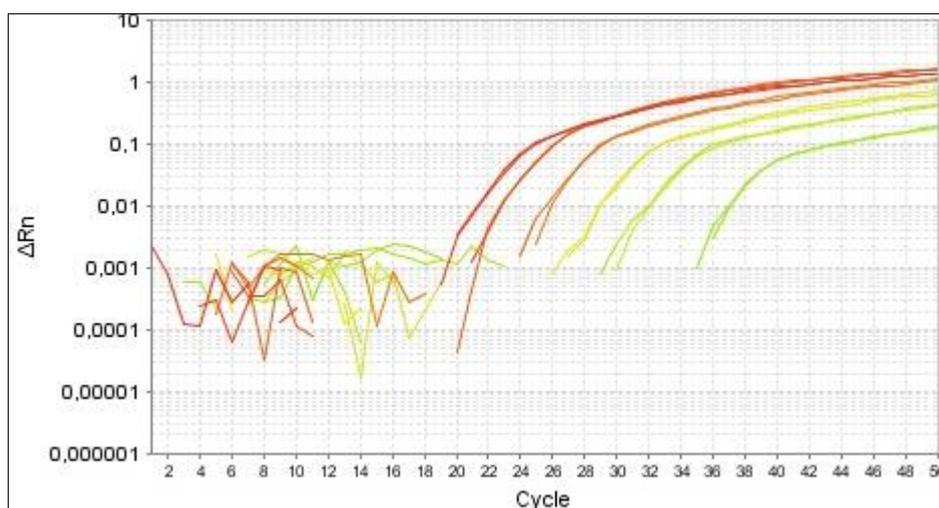


Figura 3 - Representação gráfica da amplificação por qPCR das diluições de *S. aureus* ATCC 29213 em leite cru bovino, na proporção de 1:10, utilizadas para determinar a sensibilidade analítica método de qPCR proposto. Os Ct médios (21,21, 23,09, 25,76, 29,34, 32,60 e 36,70, respectivamente) são relativos à amplificação, em duplicata, das amostras contendo, respectivamente, $4,2 \times 10^6$, $5,6 \times 10^5$, $4,3 \times 10^4$, $2,0 \times 10^3$, $1,7 \times 10^2$, $1,04 \times 10^1$ UFC/mL, estimados pela regressão $\log_{10}\text{UFC} = 37,86 - 23,54 \log_{10}\text{Ct}_{\text{SAU}}$

A especificidade analítica é definida como a capacidade de um teste para distinguir o agente em estudo de outros agentes infecciosos, determinada por meio da análise de patógenos geneticamente relacionados, e quando possível, de amostras de campo, obtidas de animais portadores da doença (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010). Para a presente investigação, foram utilizados agentes sem relação genética com o *S. aureus* (*Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*), estafilococos coagulase-negativo, todos isolados de casos de mastite. Os agentes de maior homologia genética com o *S. aureus*, o *Staphylococcus hyicus* e o *Staphylococcus intermedius*, também foram incluídos no estudo para a verificação da inespecificidade do *primer* SAU diante de seus ácidos nucleicos. Em todas as amostras verificou-se a amplificação do gene codificante do citocromo mitocondrial

bovino, presentes nas células somáticas bovinas (Figura 4), mas em nenhuma foi observada qualquer sinalização de amplificação do gene *nuc*.

O citocromo B está relacionado ao transporte trans membranar de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria de mamíferos, e é o único codificado pelo DNA mitocondrial (IRWIN; KOCHER; WILSON, 1991). O gene que codifica o citocromo B mitocondrial bovino possui aproximadamente 1,5 kb (ANDERSON et al., 1982), e é uma sequência de cópia única e baixo índice de mutação (HASSANIN; DOUZERY, 1999). Adotado como controle positivo, possibilitou verificar que, uma vez que o anelamento do *primer* BMCB e consequente amplificação do alvo gênico ocorressem, tanto o protocolo de extração como o de amplificação foram adequadamente executados, mesmo quando o *S. aureus* não estivesse presente na amostra, ou quando outros patógenos (não *S. aureus* relacionados) utilizados para verificação da especificidade do *primer* SAU, fossem inoculados na amostra.

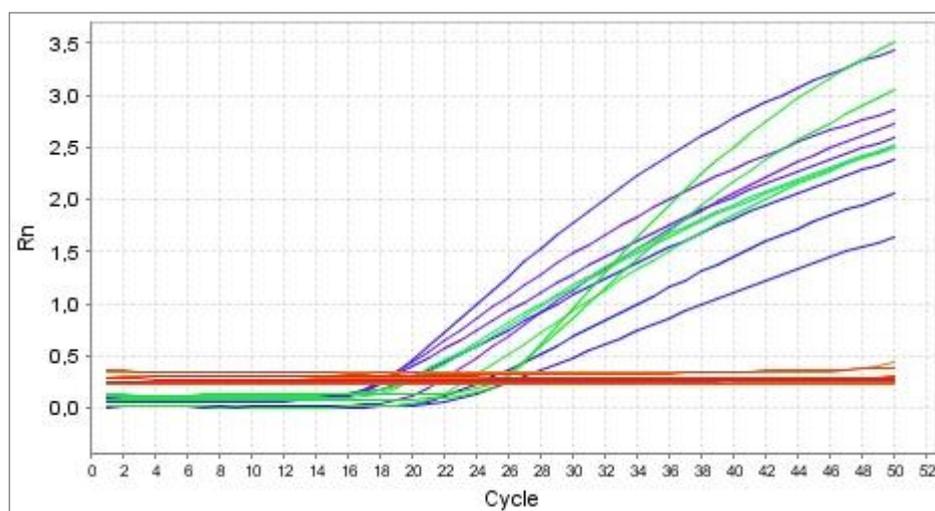


Figura 4 - Representação gráfica da reação de qPCR para avaliação da especificidade analítica do protocolo utilizando o primer SAU. A amplificação do gene bovino visado pelo primer BMB foi observada em todas as reações, mas nenhuma mudança no sinal de amplificação do gene *nuc* foi verificada para os eluídos de extração contendo *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, os estafilococos coagulase-negativa, e as espécies coagulase-positiva *S. hyicus* e *S. intermedius*

O gene *nuc*, até o presente reportado em todas as cepas de *S. aureus* relacionados à mastite bovina (BRAKSTAD; AASBAKK; MAELAND, 1992; FOURNIER et al., 2008), não está entre outras espécies epidemiologicamente importantes de estafilococos coagulase positivo, incluindo o *S. hyicus* e o *S. intermedius* (CAPURRO, 2009), bem como em outros agentes etiológicos relevantes da enfermidade (GRABER et al., 2009), o que confere a elevada especificidade analítica do oligonucleotídeo direcionado para esse alvo. Estudos biomoleculares que também utilizaram protocolos de amplificação visando o gene *nuc*,

igualmente verificaram elevada especificidade deste gene frente à espécies não-hemolíticas de estafilococos (FOURNIER et al., 2008), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp. (KIM et al., 2001), *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* (FOURNIER et al., 2008; GRABER et al., 2009), o que fundamenta a utilização deste gene como alvo de elevada especificidade para provas baseadas na PCR.

Apesar do índice de especificidade analítica de 100%, Boss et al. (2011) adotaram o gene codificante da enteroxina D (gene *sed*) como alvo de detecção do *S. aureus* por meio do qPCR, verificaram sensibilidade analítica de 10 UFC/mL do patógeno em amostras de leite de tanque sem qualquer tratamento ou incubação prévia. Entretanto, em função do supracitado gene estar presente somente entre os *S. aureus* genótipo B, os autores constataram menor sensibilidade diagnóstica da metodologia frente à amostras de leite contendo outras cepas mais prevalentes do *S. aureus* causadores de mastite bovina.

A maior repetibilidade dos testes diagnósticos baseados no método de PCR consiste na minimização da variabilidade de resultados observados entre replicatas independentemente analisadas (após otimizados e padronizados os processos de extração e amplificação). Dessa forma, para avaliação da consistência intra e interensaio de toda metodologia adotada para detecção e quantificação do *S. aureus* no presente experimento, considerou-se aceitável uma variação (CV – coeficiente de variação) de até 5% (BUSTIN, 2004) entre os valores de Ct obtidos (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficientes de variação intra e inter ensaios do número de ciclos de amplificação, das amostras de leite com contagens decrescentes de *S. aureus*, submetidas por quatro vezes ao método de qPCR, em dois dias diferentes

Amostra	UFC/mL ^a	Ensaio dia 1 ^b			Ensaio dia 2 ^b			CV 1,2 ^e (%)
		Ct ^c A'	Ct ^c A''	CV ^d A(%)	Ct ^c B'	Ct ^c B''	CV ^d B(%)	
1	9,0 × 10 ⁶	21,61	21,70	0,29	20,55	21,00	1,55	2,93
2	3,2 × 10 ⁵	23,15	23,40	0,76	23,20	22,87	1,02	0,72
3	3,0 × 10 ⁴	25,91	26,18	0,74	25,50	25,44	0,16	1,58
4	1,4 × 10 ³	29,37	29,25	0,31	29,73	29,00	1,76	0,13
5	3,0 × 10 ²	32,40	32,15	0,53	32,95	32,88	0,16	1,39
6	1,3 × 10 ¹	37,25	37,12	0,25	38,97	38,03	1,72	2,45

^a Contagem de *S. aureus* ATCC 29213, em UFC/mL, pela metodologia de referência (3M Petrifilm® Staph Express Count Plate)

^b Ensaio independentes A' e A'', B' e B'', realizados em dois dias independentes, 1 e 2

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

^d Coeficiente de variação entre os Ct's obtidos dos ensaios A' e A'', e B' e B''.

^e Coeficiente de variação entre os Ct's obtidos dos ensaios executados nos dias 1 e 2

Os CV intra ensaios para a amostra de leite com a maior concentração do patógeno (9×10^6 UFC/mL) foram de 0,29 e 1,55%, nos dias A e B, respectivamente. Quando considerada a menor concentração do *S. aureus* ($1,3 \times 10^1$ UFC/mL), os CV intra ensaios foram de 0,25 e 1,72%, respectivamente, nos dias A e B, em que toda a metodologia foi executada (extração do DNA do patógeno presente no leite e amplificação do gene *nuc* por qPCR). A variação dos resultados obtidos entre os dois dias em que a metodologia foi executada foi de 2,93% para a amostra contendo 9×10^6 UFC/mL de *S. aureus*, e de 2,45% para a amostra contendo $1,3 \times 10^1$ UFC/mL da bactéria. A variabilidade observada no presente estudo foi menor que a obtida por Graber et al. (2007), que observaram variâncias intra e inter ensaios de 1,1 e 3,2% entre replicatas com contagens de 10^6 e 5×10^3 UFC/mL, respectivamente, e de 3,7 e 6,5%, respectivamente, entre os dias em que os ensaios foram realizados.

Com base nesses resultados é possível inferir que o método sugerido apresentou repetibilidade adequada (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010) para a detecção do *S. aureus* em amostras de leite, com contagens variando entre 9×10^6 e $1,3 \times 10^1$ UFC/mL da bactéria. Entretanto, uma vez que os maiores coeficientes de variação do ensaio foram verificados entre as amostras contendo a maior e a menor concentração do patógeno, 2,93% e 2,45%, respectivamente, há que se aventar a possibilidade de comprometimento da sensibilidade analítica do método proposto, em algum grau, quando da análise de amostras de leite contendo outra concentração do patógeno que não aquela abrangida pelo estudo. Diante desta hipótese, a otimização dos procedimentos de isolamento do DNA e da reação de amplificação (BUSTIN, 2004), poderiam elevar a repetibilidade do método proposto, contendo o potencial decréscimo de sensibilidade analítica do método frente à amostras com contagens maiores que 9×10^6 UFC/mL e menores que $1,3 \times 10^1$ UFC/mL, fato que pode ser verificado em amostras de leite de quartos mamários com infecções subclínicas (1 UFC/mL) (WALKER; RAJALA-SCHULTZ; DEGRAVES, 2010), ou aquelas provenientes de quadros clínicos agudos da mastite pelo *S. aureus* (WELLENBERG et al., 2010).

5.3 CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E CULTURA MICROBIOLÓGICA PARA O DIAGNÓSTICO DA MASTITE POR *S. AUREUS*

Os resultados obtidos da análise para a avaliação de concordância entre os métodos, cultura microbiológica convencional (método referência) e qPCR, para o diagnóstico do *S. aureus*, nas amostras de quartos mamários estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Contingência entre os resultados de detecção de *S. aureus* obtidos por cultura microbiológica e qPCR, de amostras de leite provenientes de 60 quartos mamários, coletadas assepticamente

		Cultura microbiológica		Total
		Presença	Ausência	
qPCR	Presença	43	1	44
	Ausência	0	16	16
	Total	43	17	60

Das 60 amostras de leite analisadas por cultura microbiológica para o diagnóstico da mastite (OLIVER et al., 2004), 17 apresentaram resultado negativo para o *S. aureus* e em 43 o patógeno foi isolado. Entre as mesmas amostras, analisadas por qPCR, o agente não foi detectado em dezesseis delas. Não houve amostra com isolamento positivo do agente por cultura microbiológica que tenha apresentado resultado negativo pelo método de qPCR. Assumindo o exame microbiológico convencional como referência, a sensibilidade e especificidade diagnósticas foram de 97,7 e 100%, respectivamente, dentre os quartos analisados no presente estudo. O índice de concordância diagnóstica observado entre os métodos de referência e de qPCR, para a detecção do *S. aureus*, em amostras de leite de quartos mamários infectados subclínicamente, foi de Kappa = 0,958 ($P < 0,001$). Entretanto, embora este índice Kappa indique *concordância quase perfeita* entre os resultados obtidos pelos métodos (ALTMAN, 1991), com um percentual geral de concordância de 98,33%, e os percentuais de concordância positiva e negativa, respectivamente, de 100% e 94,11% (FDA-USDA, 2007), há que se considerar a imperfeição diagnóstica da cultura microbiológica para o isolamento do *S. aureus* a partir de amostras de leite de quartos mamários, e chances de até 25% de resultados falso negativos quando da análise de uma única amostra de leite tomada da glândula doente (SEARS et al., 1990). E, muito embora o *National Mastitis Council* considere os resultados obtidos por cultura microbiológica como “definitivos” para o diagnóstico da mastite bovina (OLIVER et al., 2004), mesmo com etapas adicionais de pré incubação (ARTURSSON; NILSSONÖST; PERSSON WALLER, 2010) o método tem se mostrado uma referência diagnóstica imperfeita (KOSKINEN et al., 2009; WELLENBERG et al., 2010), e mantém o diagnóstico da mastite por *S. aureus* como o ponto de maior preocupação em relação à epidemiologia da doença (KOSKINEN; HOLOPAINEN; SALMIKIVI, 2010), especialmente diante dos entraves para seu tratamento (GENTILINI et al., 2000; ZECCONI, 2006; BENGTSSON et al., 2009).

Assim, reconhecidas as limitações de sensibilidade e especificidade do *gold standard* para o diagnóstico definitivo da mastite estafilocócica bovina (OLIVER et al., 2004), estudos que utilizaram a reação em cadeia da polimerase para a detecção do *S. aureus* foram propostos de maneira à complementar ou mesmo substituir a forma convencional de diagnóstico (GILLESPIE; OLIVER, 2005; GRABER et al., 2007; STUDER et al., 2008; TAPONEN et al., 2009; BOSS et al., 2011), e demonstraram que a adoção da cultura microbiológica como método de referência conduz à valores subestimados de sensibilidade e especificidade, reforçando que as estimativas reais de sensibilidade e especificidade da mastite bovina baseadas nas provas de PCR podem ser ainda maiores (KOSKINEN et al., 2010). Diante disso, se assumidos os valores obtidos pelo método de qPCR proposto, a sensibilidade e especificidade diagnósticas do exame passariam para 100% e 94,12%, respectivamente, uma vez que 16 amostras se mostraram negativas para a presença do patógeno, enquanto 17 no total foram negativas. Utilizando-se de sistema comercial para detecção simultânea de patógenos causadores da mastite por qPCR (PathoProof[®] Mastitis PCR Assay, Finzymes Oy, Espoo, Finlândia) em amostras de quartos subclínicamente infectados, alguns autores relataram discrepâncias entre as estimativas de prevalência obtidas entre o método biomolecular e a microbiologia convencional. Wellenberg et al. (2010) constataram 24% a mais de amostras positivas pela prova biomolecular que as obtidas pelo exame microbiológico convencional. E, em uma das 38 amostras com isolamento negativo obtidas pelos autores, houve amplificação do gene do *S. aureus*. Adotando a mesma metodologia para sua validação como exame de triagem em 93 quartos mamários saudáveis, Koskinen et al. (2010) encontraram 7 amostras positivas, enquanto 4 tiveram diagnóstico positivo para mastite pela cultura microbiológica.

No presente estudo, embora o *S. aureus* tenha sido detectado por qPCR em somente uma das amostras, dentre as 17 que apresentaram resultado negativo pela cultura microbiológica, Graber et al. (2007) observaram maior proporção de reações positivas. Naquele estudo, entretanto, os autores submeteram todas as amostras, coletadas em três dias consecutivos, aos exames diagnósticos, por cultura e qPCR, e não somente amostras com $CCS > 250.000$ CS/mL, limiar adotado no presente experimento, para a avaliação da concordância entre métodos, e verificaram amplificação do gene *nuc* em 3 amostras de leite com $CCS < 250.000$, sem isolamento de *S. aureus* no exame microbiológico convencional, dentre as 33 analisadas.

Uma vez que a menor validade preditiva dos resultados negativos obtidos pela microbiologia convencional poderia comprometer as ações para controlar a transmissão do

patógeno num dado rebanho, há que se considerar a validade preditiva dos resultados positivos obtidos pelas provas diagnósticas baseadas em PCR. Portanto, considerando-se os valores de sensibilidade e especificidade diagnósticas obtidos pelo teste biomolecular utilizado para detecção do *S. aureus* dentre os quartos mamários analisados (100% e 94,12%, respectivamente), revelar-se-ia uma prevalência real de 73,4% de mastite estafilocócica dentre os tetos analisados, frente à prevalência aparente de 71,3% do patógeno determinada pela cultura microbiológica.

5.4 EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE CONTAGEM ELETRÔNICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS BOVINAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE CONSERVADAS COM BRONOPOL

O resultado do teste da hipótese de equivalência entre as metodologias para quantificação de células somáticas no leite bovino e, portanto, a possibilidade do uso intercambiável entre elas, está apresentado nas figuras 5 e 6.

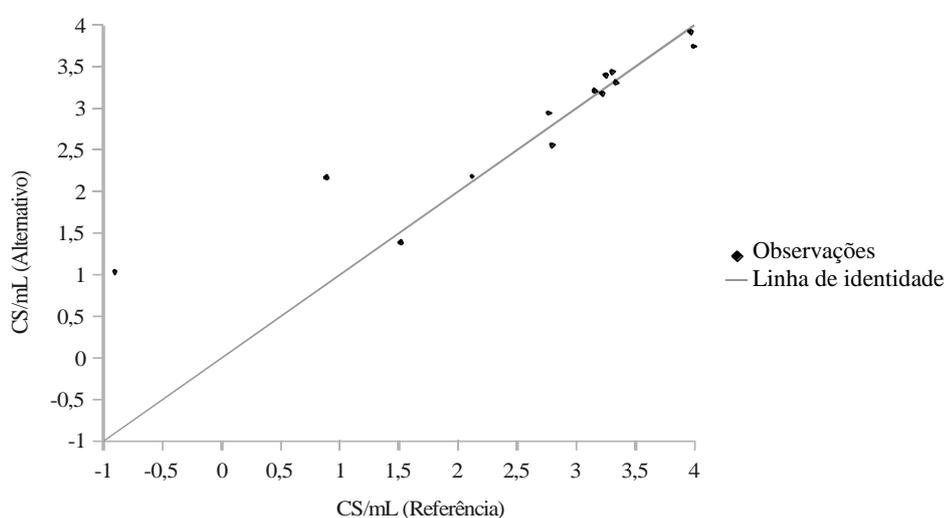


Figura 5 - Gráfico de identidade entre as contagens de células somáticas, em \log_{10} CS/mL, obtidas pelos métodos de qPCR [CS/mL(qPCR)] e de citometria de fluxo [CS/mL(Referência)]

A figura 5 apresenta a dispersão das duas mensurações obtidas pelos métodos de citometria de fluxo e de qPCR, em contiguidade com a curva $y=x$, sem os desvios entre as medidas tomadas, de modo que tanto maior é a concordância entre os dois métodos de mensuração quanto maior a contiguidade dos pontos de observação ao longo da linha de

identidade (BLAND; ALTMAN, 2010). Uma vez que a condição para verificar se dois métodos de quantificação são equivalentes entre si é a de que ambos se utilizem da mesma escala de mensuração (BLAND; ALTMAN, 2010), os dados de Ct obtidos a partir da amplificação do gene B_{MCB} bovino por qPCR foram submetidos à equação de regressão, $\log_{10}CCS = 49,3 - 34,0 \log_{10}Ct_{B_{MCB}}$.

Na figura 6 se verifica a magnitude das diferenças entre as contagens de células somáticas obtidas pelo método de citometria de fluxo e as estimadas pela PCR em tempo real, em $\log_{10}CS/mL$, em relação à média de resultados obtidos entre os dois métodos. Os dados deveriam ter dispersão constante ao longo da linha de identidade (BLAND; ALTMAN, 2010), entretanto, tal fato não ficou evidente devido ao número reduzido de amostras analisadas. Embora o n analisado entre os métodos tenha sido limitado, a diferença média entre as duas metodologias não foi significativa e, portanto, ambas se mostraram equivalentes ($P = 0,101$). A amplitude do intervalo de confiança (IC 95%) variou de -1,003 à 1,677, que se traduz numa discrepância de 500 CS/mL entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($\log_{10}CS/mL = 2,7$), diferença pouco relevante do ponto de vista clínico quando da avaliação da mastite bovina pela CCS em nível de quarto mamário (DOHOO; MEEK, 1982).

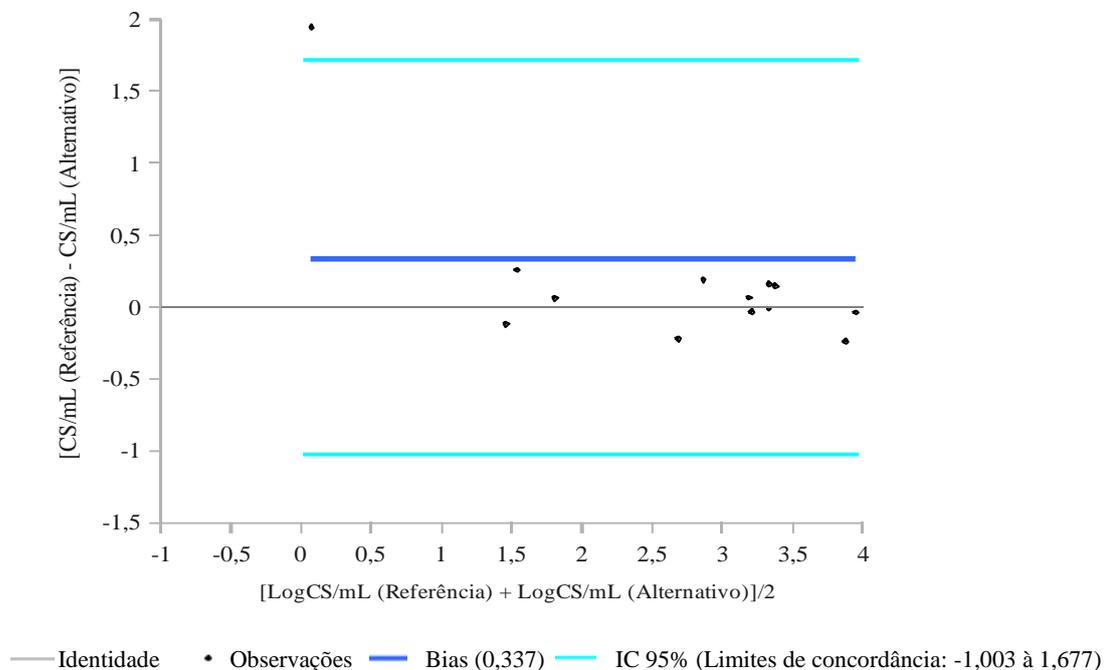


Figura 6 - Representação gráfica da média entre os resultados de CCS em função das diferenças observadas entre os resultados de CCS (ambos em $\log_{10}CS/mL$), obtidos pelos dois métodos. O *Bias* (0,337) é a diferença média entre os valores de CCS obtidos pelas duas formas de mensuração e os valores limites de concordância entre os métodos variaram de -1,003 à 1,677

A contagem de células somáticas indica o nível de inflamação resultante de infecção da glândula mamária bovina, e sua determinação por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico é o método de rotina reconhecido para uso pelos laboratórios de análise da qualidade do leite de todo o mundo (International Organization for Standardization & International Dairy Federation, International Standard - ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:2006). O resultado de CCS, associado ao da cultura microbiológica, contribui para estabelecer as medidas de controle da mastite no rebanho (BARKEMA et al., 1997). Entretanto, a utilização do bronopol como agente bactericida, necessário para a conservação da amostra destinada à CCS (CASSOLI; MACHADO; COLDEBELLA, 2010) impossibilita a cultura microbiológica a partir da mesma, e exige a coleta de uma segunda amostra, asséptica e sem conservante, do quarto afetado (SEŠKĚNA; JANKEVICA, 2007). Esta amostra, sem conservante, pode ser congelada, mas a conservação por congelamento a inviabiliza para a análise da CCS (BARKEMA et al., 1997). O bronopol presente na amostra destinada à CCS pelo método proposto, não influenciou a extração do DNA mitocondrial bovino, nem gerou agentes inibidores de amplificação do gene BMCB por qPCR, possibilitando a determinação da contagem de células somáticas de forma equivalente à citometria de fluxo opto eletrônica a partir da mesma.

Uma vez que o alvo adotado para a quantificação da célula somática bovina pelo método proposto foi o gene codificador do citocromo B, presente no DNA mitocondrial do hospedeiro, a diferença da celularidade na resposta inflamatória poderia se constituir num alvo passível de flutuação quantitativa, já que a mitocôndria possui papel importante na via inflamatória de leucócitos (RATHMELL; THOMPSON, 1999) e, portanto levar à sub ou super estimativa da CCS determinada a partir da regressão $\log_{10}CCS = 49,3 - 34,0 \log_{10}Ct_{BMCB}$. Entretanto, as diferenças quantitativas da organela se dão somente em função do tipo celular recrutado para conter o patógeno, e não acontecem durante o ciclo celular de uma mesma célula (SAMUELSON, 2007), o que demonstrou adequação do alvo adotado para controle positivo e estimativa da CCS pelo método de qPCR de amostras com contagens variando de 11×10^3 CS/mL a $5,66 \times 10^6$ CS/mL conservadas com bronopol.

5.5 EQUIVALÊNCIA ENTRE OS MÉTODOS DE QPCR E DE REFERÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO *S. AUREUS* EM AMOSTRAS DE LEITE

A análise de Bland-Altman foi utilizada para avaliar o nível de concordância entre os dois métodos e comparar o qPCR à metodologia de referência. O resultado da análise entre eles, para a determinação do número de *S. aureus* em amostras de leite bovino está apresentada nas figuras 7 e 8.

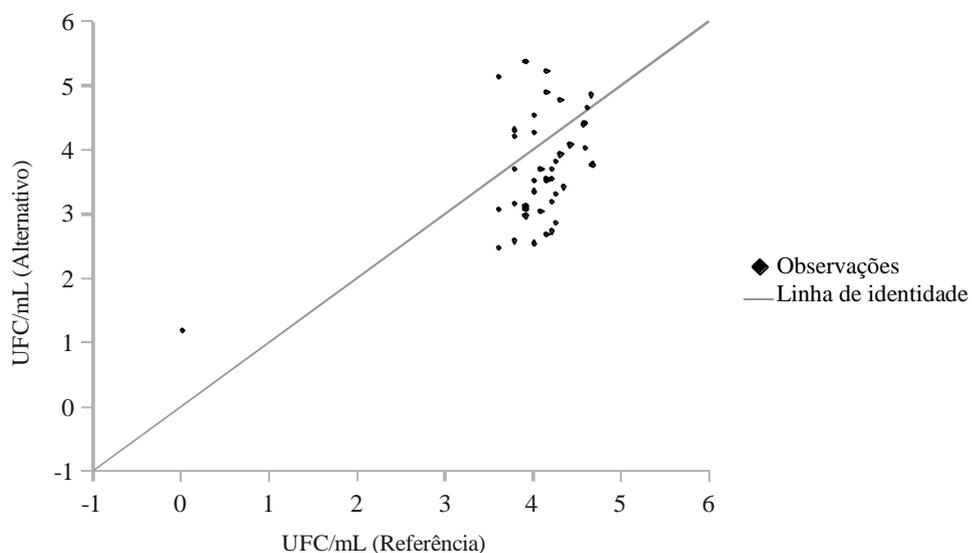


Figura 7 - Gráfico de identidade entre as contagens de *S. aureus* (em \log_{10} UFC/mL) obtidas pelos métodos de qPCR [UFC/mL(Alternativo)] e de referência [UFC/mL(Referência)]

A figura 7 representa graficamente a dispersão das duas mensurações obtidas pelos métodos de referência (representado no eixo x), que variaram de $3,9 \times 10^3$ UFC/mL à 50×10^3 UFC/mL, e estimadas pelo qPCR (representado no eixo y), variando de 300 UFC/mL à 250×10^3 UFC/mL, plotados um contra o outro, sem os desvios observados entre as medidas.

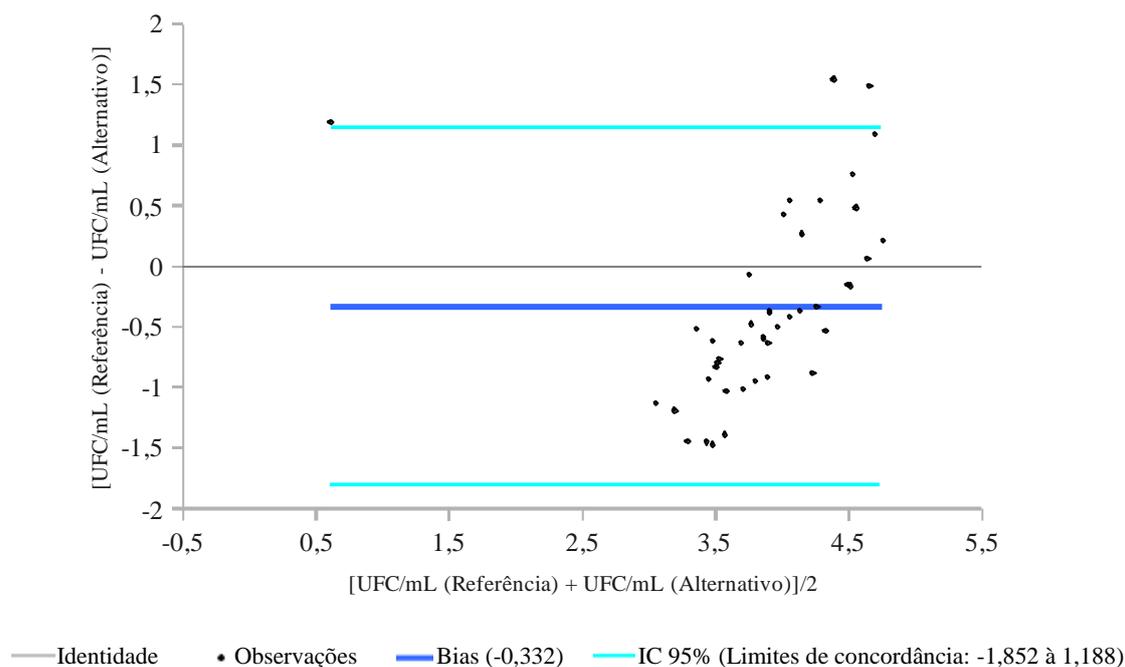


Figura 8 - Representação gráfica da média entre os resultados de UFC/mL de *S. aureus* em função das diferenças observadas entre os resultados da contagem do patógeno obtidos pelos dois métodos (ambos em \log_{10} UFC/mL). O *Bias* (-0,332) é a diferença média entre os valores de UFC/mL por ambos métodos e os valores limites de concordância entre eles variaram de -1,852 à 1,188

Na figura 8 está ilustrada a magnitude das diferenças entre as contagens do patógeno obtidas pelos métodos de contagem em placas e estimadas pelo qPCR, em \log_{10} UFC/mL, em relação à média de resultados obtidos entre os dois métodos. Os dados deveriam ter dispersão constante ao longo da linha de identidade (BLAND; ALTMAN, 2010), entretanto, a diferença média entre as duas formas de mensuração foi significativa e, portanto, são formas diferentes de quantificar o *S. aureus* em amostras de leite provenientes de quartos subclínicamente infectados e não podem ser usadas intercambiavelmente ($P = 0,0069$). Embora as contagens do *S. aureus* nas amostras de leite obtidas de quartos subclínicamente infectados obtidas por qPCR e pela metodologia de referência não tenham sido equivalentes, há que se ressaltar que as contagens de *S. aureus* ATCC 29213 por qPCR nas amostras de leite artificialmente contaminadas apresentaram correlação forte e significativa ($r = -0,989$; $P < 0,001$) com a metodologia de referência, como demonstrado anteriormente. A não equivalência poderia ser devida à presença de *S. aureus* mortos ou não cultiváveis nas amostras clínicas de leite, uma vez que se espera a ação de mecanismos intrínsecos da imunidade celular e humoral do hospedeiro sobre a viabilidade do patógeno causador da mastite, ainda que não se debeat a infecção (BARRIO; RAINARD; POUTREL, 2003). Por conseguinte, a presença de DNA genômico que contivesse o fragmento do gene *nuc* de *S. aureus*, em quantidades iguais ou superiores ao limite de detecção obtido e relatado de 10 UFC/mL, independente da

integridade e viabilidade do microrganismo, seria passível de detecção e quantificação pelo método de qPCR utilizado no presente estudo. Alternativamente, Nogva et al. (2003) propuseram a utilização de brometo de etídeo monoazídico para inibir a amplificação por PCR do DNA de bactérias mortas, o que poderia contribuir para o aumento da concordância entre os resultados obtidos por qPCR e a contagem em placas do *S. aureus*.

Hein et al. (2005) também verificaram correlação significativa entre os resultados de enumeração do gene *nuc* por qPCR e a contagem em placas das amostras de leite bovino inoculadas com *S. aureus*, e igualmente relataram baixa concordância entre os resultados obtidos das amostras naturalmente contaminadas. Graber et al. (2007), entretanto, verificaram correlação forte e significativa entre o número de *S. aureus* obtido pela contagem em placas e o qPCR ($r = 0,92$; e $P < 0,001$), afirmando a possibilidade de estimar a quantidade do patógeno no leite por meio do método biomolecular. No presente estudo a verificação de equivalência entre métodos para quantificação do patógeno em amostras de leite foi conduzida, do ponto de vista estatístico, de maneira apropriada à finalidade (LUDBROOK, 2002), ao passo que a abordagem estatística adotada nos estudos de Graber et al. (2007), que utilizaram o produto-momento de Pearson, não permite verificar equivalência entre métodos que quantifiquem um variável contínua, e sim avalia a correlação entre tais variáveis para determinação do grau de interdependência entre as mesmas (LUDBROOK, 2006), fato que justificaria a discordância entre os resultados obtidos no presente estudo e os referenciados pelos citados autores.

A discrepância média de 0,4 unidades logarítmicas entre as contagens do patógeno obtidas a partir dos métodos utilizados nesta pesquisa (médias de 4,1 \log_{10} UFC/mL e 3,7 \log_{10} UFC/mL, para o qPCR e a contagem em placas, respectivamente), poderia ser ainda justificada pela diferença de UFC/mL observada durante a fase estacionária de crescimento de *S. aureus* de diferentes cepas (HEIN et al., 2001), bem como pela variação do conteúdo genômico que se verifica entre as diferentes fases de crescimento de uma mesma célula (LUDWIG; SCHLEIFER, 2000), o que impossibilitaria a estimativa do número de células bacterianas a partir da quantificação do gene *nuc* por meio do qPCR. Sendo assim, a equação de regressão $\log_{10}\text{UFC} = 37,86 - 23,54 \log_{10}\text{Ct}_{\text{SAU}}$ não se aplicou de forma equivalente à contagem em placas para estimar a contagem de *S. aureus* viáveis em amostras de campo, haja vista fora construída com base na quantificação do número de cópias do gene *nuc* presentes nas amostras de leite artificialmente contaminadas com o *S. aureus* ATCC 29213. Ou seja, como cada cópia do gene *nuc* detectado por qPCR indicou uma célula de *S. aureus* que, viável ou não, estava presente na amostra, o método poderia representar maior

capacidade diagnóstica, mesmo que retrospectivamente, da presença do patógeno em quartos mamários, ainda que subclínicamente infectados. Ainda que a estimativa da UFC/mL por qPCR não se equivalha às contagens de *S. aureus* pelo método de referência, a consistente detecção do patógeno em amostras provenientes de quartos com uma baixa eliminação de células bacterianas, *per se*, dá ao método biomolecular apresentado a vantagem sobre a microbiologia convencional, especialmente frente a probabilidade elevada de resultados falso-negativos pelo método quando apenas uma amostragem da glândula mamária afetada é realizada (SEARS et al., 1990). Se esses quartos com eliminação intermitente do patógeno representam uma constante fonte de infecção para os outros quartos mamários no rebanho, a possibilidade de um resultado diagnóstico em 6 horas representaria outro benefício do método de qPCR diante do período mínimo de 48 horas, necessário para o diagnóstico pela microbiologia convencional (OLIVER et al., 2004).

5.6 ESTIMATIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E A CONTAGEM DE *S. AUREUS* EM AMOSTRAS DE LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS

A dinâmica da resposta celular inflamatória bovina frente à colonização da glândula mamária pelo *S. aureus* foi medida a partir da avaliação do grau de relação entre a CCS e as contagens do patógeno, determinadas pelos métodos de referência (Figura 9) e de qPCR (Figura 10), respectivamente.

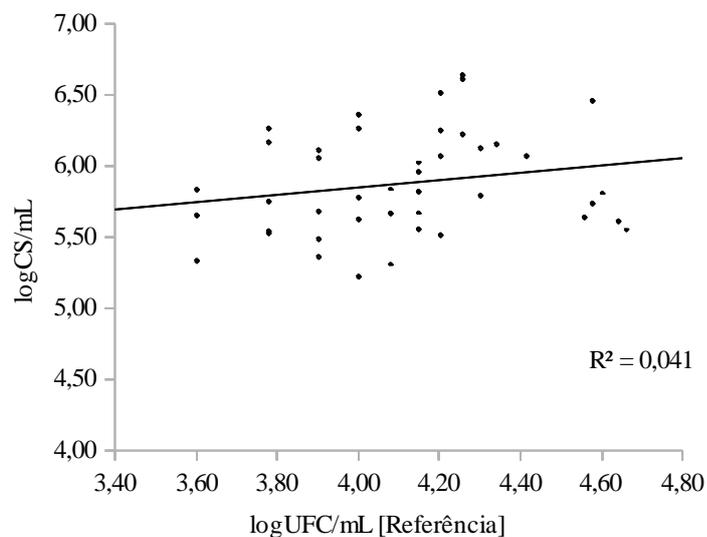


Figura 9 - Correlação ($r = 0,201$; $P = 0,1948$) entre as contagens de *S. aureus* viáveis (\log_{10} UFC/mL [Referência]) e de células somáticas (\log_{10} CS/mL), respectivamente, obtidas de amostras de leite de 43 quartos mamários

A análise do produto-momento entre o número de UFC/mL de *S. aureus* determinado pelo método de contagem em placas e a CCS em amostras de leite de quartos mamários demonstrou ausência de relação de dependência entre as variáveis ($P = 0,1948$), fato também relatado por Walker et al. (2010), que avaliaram a variação diária das contagens de *S. aureus* e de células somáticas em quartos mamários subclínicamente e naturalmente infectados pelo patógeno, também não observaram correlação entre as duas contagens. Shoshani et al. (2000), entretanto, identificaram o padrão cíclico senoidal de eliminação do patógeno pela glândula observado por Sears et al. (1990) concomitantemente acompanhado pela CCS após produzirem infecções subclínicas crônicas por meio da inoculação da cepa VL-8407 de *S. aureus*.

Embora o delineamento experimental adotado no presente estudo não tenha contemplado amostragens sucessivas dos quartos infectados, condição essa sugerida pelo NMC (OLIVER et al., 2004) para o correto diagnóstico da mastite por *S. aureus* diante da intermitente eliminação do patógeno (SEARS et al., 1990), foi verificada uma discreta diminuição da CCS à medida que a quantidade de patógenos, estimada pelo qPCR, aumentou (Figura 10).

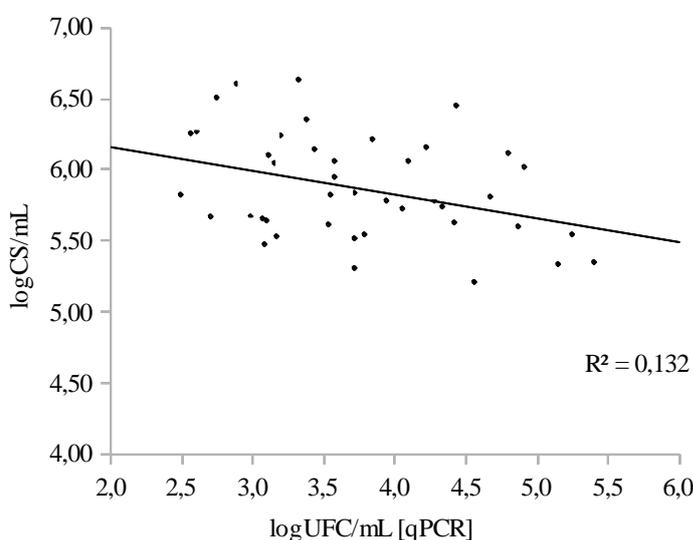


Figura 10 - Correlação ($r = -0,363$; $P < 0,0167$) entre a contagem estimada de *S. aureus* (\log_{10} UFC/mL[qPCR]) pelo método de qPCR e a contagem de células somáticas (\log_{10} CS/mL), respectivamente, obtidas de amostras de leite de 43 quartos mamários

Apesar da baixa relação de interdependência entre as contagens ($R^2=0,132$), foi possível verificar as menores CCS nas amostras com as maiores contagens do patógeno estimadas pelo qPCR. Apesar da estimativa da UFC/mL de *S. aureus* pelo qPCR não ter

sido considerada uma forma alternativa ao método de referência para contagem do patógeno, e das amostragens para as contagens da bactéria e de células somáticas terem sido apenas pontuais, é possível a descrição, mesmo que linear e discretamente ($r = -0,363$; $P < 0,0167$), da tendência à relação inversa entre células somáticas e o número de *S. aureus* outrora reportada por (DALEY et al., 1991). Naquele estudo, Daley et al. (1991) avaliaram a CCS de quartos mamários durante cinco dias, após a infecção experimental e concomitante com o *S. aureus* ATCC 29740, e verificaram comportamento oposto ao da frequência e da amplitude do número de bactérias eliminadas pelas glândulas, mas que tal tendência não foi verificada ao mesmo tempo entre todas as glândulas durante o período do estudo. A resposta imune celular do hospedeiro, portanto, tenderia a um comportamento de ciclicidade senoidal, porém inverso ao padrão cíclico de colonização e eliminação do *S. aureus* pelas glândulas infectadas identificado por Sears et al. (1990).

O comportamento de ciclicidade senoidal de eliminação do *S. aureus* pela glândula infectada proposto por Sears et al. (1990), mas contraposto como “intermitente” por outros autores (GRABER et al., 2007; WALKER et al., 2010), pode ter sua justificativa baseada na interação que se estabelece entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro nas infecções subclínicas, o que permitiria uma melhor compreensão da situação observada no presente estudo, em que o número estimado de UFC/mL do patógeno era maior quando a CCS era menor: uma vez estabelecido o quadro de cronicidade observado numa infecção intramamária subclínica, a população de *S. aureus* aumenta progressivamente na glândula durante 6 a 7 dias (STUDER et al., 2008), situação a partir do qual o sistema imune da vaca, também progressivamente, retoma a montagem de uma resposta, predominantemente linfocitária no caso da infecção crônica e subclínica (SHOSHANI et al., 2000; SORDILLO; STREICHER, 2002), para conter sua proliferação. Em seguida, inicia-se o decréscimo do número de *S. aureus* na glândula, decorrente de sua eliminação pelo sistema imune, o qual não é completamente sucedido, seja pela capacidade da bactéria de invadir e parasitar as células epiteliais da glândula mamária (ALMEIDA et al., 1996; HÉBERT et al., 2000) e as células do sistema imune do hospedeiro (GRESHAM et al., 2000); pelos seus fatores de virulência que desencadeiam processos de lise, apoptose e contenção da proliferação do número de linfócitos (BARRIO; RAINARD; POUTREL, 2003; SLADEK et al., 2005; ZECCONI et al., 2005; ZECCONI et al., 2006); ou supressão do sistema imune da glândula mamária observada durante infecções persistentes pelo *S. aureus* (DOYMAZ et al., 1988).

A despeito de observada correlação negativa entre a contagem do patógeno estimada pelo qPCR e a CCS no presente estudo, o coeficiente de determinação foi baixo ($R^2=0,132$), o

que permite elucubrações acerca da variabilidade da patogenicidade das células de *S. aureus* responsáveis pelas infecções intramamárias pesquisadas. Fournier et al. (2008) demonstraram que a maioria dos *S. aureus* genótipos C, O e G causam infecções intramamárias com CCS ligeiramente superiores aos limites fisiológicos. Interessantemente, no presente estudo 4 quartos mamários apresentaram CCS entre 163 e 226×10^3 CS/mL, dos quais 2 foram os que apresentaram as maiores contagens estimadas do patógeno pelo qPCR ($1,42 \times 10^6$ UFC/mL e $2,48 \times 10^6$ UFC/mL, com 216×10^3 CS/mL e 226×10^3 CS/mL, respectivamente). O *S. aureus* genótipo B, entretanto, determina as maiores CCS (FOURNIER et al., 2008), é o mais contagioso dentre os genótipos (BOSS et al., 2011) e está associado com a maior severidade dos sintomas (HAVERI et al., 2005). No presente estudo, os outros 39 quartos mamários apresentaram CCS entre 301×10^3 CS/mL e $4,3 \times 10^6$ CS/mL. Apesar da identificação genotípica do *S. aureus* não ter sido motivo de estudo na presente pesquisa, diante da presença do gene *nuc*, comum entre os genótipos B, C, O e G, todos os genótipos do patógeno seriam passíveis de detecção e quantificação pelo método proposto, embora nenhum desses subtipos terem sido reportados em estudos brasileiros até a presente data (RABELLO et al., 2005).

5.7 EFEITO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *S. AUREUS* SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE, GORDURA, PROTEÍNA BRUTA, PROTEÍNA VERDADEIRA E CASEÍNA, E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO QUARTO MAMÁRIO AFETADO PELO MICRORGANISMO

Uma vez que uma variação natural, de certa magnitude, em alguns componentes lácteos, e entre quartos mamários era esperada (NATZKE et al., 1965), procedeu-se a análise da composição do leite dos quartos mamários ipsilaterais preliminarmente à avaliação do efeito da infecção pelo *S. aureus*, e os resultados, segundo seu posicionamento, anterior ou posterior, e independente do status sanitário, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira, caseína e contagem de células somáticas do leite dos quartos mamários ipsilaterais

Variável	Quartos mamários				
	Anteriores	EPM ¹ (n) ²	Posteriores	EPM ¹ (n) ²	P
Lactose (%)	4,27	0,087 (10)	4,43	0,071 (18)	0,1008
Gordura (%)	3,93	0,249 (10)	3,76	0,211 (18)	0,5024
Proteína bruta (%)	3,36	0,119 (10)	3,22	0,118 (18)	0,0011
Proteína verdadeira (%)	2,98	0,131 (8)	2,99	0,125 (18)	0,8281
Caseína (%)	2,41	0,101 (8)	2,45	0,099 (18)	0,2580
CCS (log ₁₀ CS/mL)	5,56	0,104 (10)	5,33	0,078 (18)	0,09

¹ EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

² (n): Número de observações

O posicionamento dos quartos mamários ipsilaterais, anterior ou posterior, não exerceu influência sobre as variáveis de composição, exceto pelo fato do teor médio de proteína bruta observado entre as amostras obtidas dos quartos anteriores ter sido maior que a média verificada entre os posteriores. A proteína bruta não esteve entre as variáveis investigadas por Natzke et al. (1965) quando analisaram a variação da composição do leite em condições normais. Já Berglund et al. (2007) não encontraram diferenças nas variáveis de composição estudadas, e entre elas a proteína bruta, entre os quartos mamários anteriores e posteriores de animais com CCS < 100.000 CS/mL em todos os quartos. Sendo assim, a diferença entre as concentrações de proteína bruta observada neste estudo poderia ter sido devido à CCS observada entre os quartos mamários anteriores (5,56 log₁₀CS/mL, ou seja, aproximadamente 365.000 CS/mL) comparada à dos quartos posteriores (5,33 log₁₀CS/mL, ou seja, aproximadamente 215.000 CS/mL). Ainda que não significativa estatisticamente ($P = 0,09$), na prática vacas com CCS média de 300.000 CS/mL produzem leite com maiores concentrações de proteína bruta e menores de caseína (AULDIST et al., 1995) e tal fato daria suporte à especulação apresentada. Em pesquisa mais recente, Coulon et al. (2002) não encontraram diferenças de concentração da proteína bruta atribuídas ao posicionamento (anterior ou posterior) dos quartos mamários, nem alterações no leite produzido por quartos sadios quando outro(s) quarto(s) de um mesmo úbere apresentou(aram) mastite. Entretanto, observaram pequenos aumentos de CCS dos quartos mamários sadios se um ou mais quartos estavam infectados por algum dos patógenos estudados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, outros estreptococos e estafilococos relevantes). Os autores também verificaram alterações de composição no leite quando consideraram o isolamento de alguns dos patógenos, em particular, o *S. aureus*. Por essa

razão, procedeu-se a análise de composição do leite segundo o status de infecção subclínica por *S. aureus*, positivo ou negativo, das amostras obtidas na presente pesquisa, e os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Efeito do *S. aureus* sobre as concentrações de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira e caseína, e contagem de células somáticas no leite de quartos mamários subclínicamente infectados

Variável	Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>				
	Positivo	Negativo	n^1	EPM(n) ²	<i>P</i>
Lactose (%)	4,32	4,38	14	0,069	0,2369
Gordura (%)	3,76	3,93	14	0,205	0,1485
Proteína bruta (%)	3,29	3,29	14	0,118	0,8417
Proteína verdadeira (%)	2,98	2,99	13	0,126	0,7338
Caseína (%)	2,41	2,44	13	0,099	0,0503
CCS (log ₁₀ CS/mL)	5,82	5,06	14	0,084	<,0001

¹ *n*: Número de observações, aos pares

² EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

Novamente, exceto para as contagens de células somáticas, que apresentaram valores médios aproximados de 660.000 e 115.000 CS/mL, entre os tetos subclínicamente afetados pelo *S. aureus* e sadios, respectivamente, não foram observadas diferenças de composição atribuídas à infecção mastite subclínica por *S. aureus*. As CCS obtidas neste estudo foram semelhantes às observadas por Coulon et al. (2002), que relataram CCS de 690.000 e 48.900 CS/mL entre os quartos mamários com e sem mastite subclínica pelo *S. aureus*, respectivamente. Ao contrário do que fora observado na presente pesquisa, os autores encontraram diferenças marcantes ($P < 0,01$) entre as concentrações de lactose (4,56 e 3,97%, respectivamente) e proteína bruta (3,29 e 3,45%, respectivamente) dos quartos mamários sadios e infectados pelo patógeno. Ainda, reportaram discreta, porém significativa diminuição na relação caseína/proteína bruta (0,82 e 0,80, entre os quartos sadios e infectados, respectivamente), embora os teores de caseína não tenham se alterado (2,63 e 2,69%, $P > 0,05$). Zafalon et al. (2008) também observaram as maiores CCS entre os quartos mamários acometidos subclínicamente pelo *S. aureus*, mas reportaram menores concentrações médias de proteínas bruta e verdadeira, e de caseína.

Apesar de aceite o fato de que a maior permeabilidade capilar durante a inflamação subclínica aumente o aporte de proteínas séricas para o interior da glândula mamária, levando ao aumento das concentrações de proteínas totais no leite (AULDIST et al., 1995), tal situação não ficou evidente no presente estudo, e os teores de proteína bruta no leite das glândulas

doentes não foram diferentes ($P=0,847$) daqueles observados nas glândulas sem infecção. Em que pesem as reportadas alterações nos teores de caseína devido à infecção intramamária subclínica pelo *S. aureus* (ZAFALON et al., 2008), sejam elas pelo aumento da concentração de enzimas endógenas no leite com atividade proteolítica de natureza sistêmica ou local (KELLY; O'FLAHERTY; FOX, 2006), ou pelo comprometimento de sua produção pelo epitélio mamário dado o dano ocasionado pela inflamação (ZHAO; LACASSE, 2008), há ainda que se considerar fatores específicos ligados ao *S. aureus* e sua interação com a resposta imune inata do hospedeiro (YOUNIS et al., 2003), responsáveis por desencadear um processo hidrolítico que pode não alterar as concentrações desta proteína no leite, mas comprometem propriedades reológicas de importância para a fabricação dos derivados da caseína (LEITNER et al., 2006). Da mesma maneira como observado no presente estudo, Leitner et al. (2006) também não verificaram diferenças significativas nos teores de lactose (4,65%), gordura (3,42%), proteína bruta (3,37%) e caseína (2,68%) no leite das glândulas com o mastite subclínica por *S. aureus* comparadas aos quartos mamários sadios quando investigaram as possíveis interações entre patógenos e a composição do leite. Aqueles autores (LEITNER et al., 2006), apesar de também terem observado maior CCS nos quartos infectados pelo *S. aureus* comparado aos quartos sadios (865.000 CS/mL versus 116.000 CS/mL, respectivamente), observaram que a análise da CCS no leite apresentou a menor capacidade preditiva de produção de queijos, pois verificaram firmeza de coalho diferentes entre queijos produzidos a partir de leites com CCS similares ($\sim 1 \times 10^6$ CS/mL), mas provenientes de quartos infectados com patógenos diferentes (*S. aureus* e *Streptococcus dysgalactiae*). Essa ausência de correlação entre a hidrólise da caseína e CCS que também fora reportada em outros estudos (URECH; PUHAN; SCHÄLLIBAUM, 1999; FORSBÄCK et al., 2010) sugere que fatores relacionados à interação entre bactéria e hospedeiro (YOUNIS et al., 2003; ZECCONI et al., 2005), e não somente o aumento da CCS, podem alterar a estrutura micelar da caseína (RUSSELL et al., 1977), e conseqüentemente sua qualidade reológica, sem que se alterem as suas concentrações no leite, como observado no presente estudo.

Assim, dada à dogmática diferença de composição do leite entre os quartos anteriores e posteriores outrora reportada (NATZKE et al., 1965) e às observadas neste estudo, foi imperativo que o modelo estatístico utilizado (SILVA et al., 2008) contemplasse os fatores fixos de variação “quartos anteriores” ou “quartos posteriores”, e a “infecção subclínica pelo *S. aureus*” no quarto mamário, tendo como referência seu respectivo contralateral sadio; além do fator aleatório “vaca”. Os resultados da análise de composição do leite de quartos

mamários contralaterais infectados subclínicamente pelo patógeno, separados entre anteriores e posteriores, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Efeito da infecção subclínica por *S. aureus* sobre as concentrações de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira e caseína, e contagem de células somáticas, segundo o posicionamento, anterior ou posterior, dos quartos mamários contralaterais

Variável	Quartos mamários anteriores					Quartos mamários posteriores					Interação ³
	Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>					Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>					
	Positivo	Negativo	<i>n</i> ¹	EPM ²	<i>P</i>	Positivo	Negativo	<i>n</i> ¹	EPM ²	<i>P</i>	
Lactose (%)	4,25	4,30	5	0,095	0,5719	4,39	4,47	9	0,076	0,2172	0,7615
Gordura (%)	3,87	3,98	5	0,265	0,5361	3,65	3,88	9	0,222	0,1094	0,6115
Proteína bruta (%)	3,36	3,36	4	0,119	0,8454	3,22	3,22	9	0,118	0,9420	0,9101
Proteína verdadeira (%)	2,96	3,00	4	0,133	0,3436	3,20	2,98	9	0,126	0,4104	0,2207
Caseína (%)	2,39	2,43	4	0,102	0,0878	2,44	2,45	9	0,100	0,2744	0,3771
CCS (log ₁₀ CS/mL)	5,97	5,14	5	0,133	0,0003	5,66	4,99	9	0,099	0,0001	0,0448

¹ *n*: Número de observações, aos pares

² EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

³ Interação: Probabilidade de efeito da interação entre metade (anterior ou posterior) e infecção subclínica pelo *S. aureus*

A infecção subclínica pelo *S. aureus* aumentou as CCS dos quartos mamários anteriores e posteriores, mas não influenciou os teores de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira e caseína do leite produzido pelas glândulas afetadas. As médias das CCS, em valores absolutos, observadas entre os quartos mamários anteriores, doente e sadio, respectivamente, foram de, aproximadamente, 935.000 e 139.000 CS/mL ($P = 0,0003$) e entre os posteriores, de 460.000 e 100.000 CS/mL ($P = 0,0001$). Embora a infecção subclínica pelo patógeno *per se* ter aumentado as CCS dos quartos mamários afetados (Tabela 5), aparentemente o seu posicionamento também contribuiu para o maior acometimento do mesmo pela doença, haja vista observou-se relação de interação significativa ($P = 0,0448$, Tabela 6) entre a infecção subclínica pelo *S. aureus* e a localização, anterior ou posterior, da glândula no úbere, para a CCS. Apesar da necessidade de se considerar a produção de leite pelos quartos para uma melhor interpretação dos resultados (Tabela 8), a CCS média das glândulas posteriores com a infecção subclínica foram numericamente menores (dados não submetidos à análise estatística) que as contagens das glândulas anteriores acometidas ($5,66 \log_{10}\text{CS/mL}$, $\pm 0,076$ e $5,97 \log_{10}\text{CS/mL}$, $\pm 0,133$, respectivamente). Tal observação é contraposta à de Barkema et al. (1997), que apesar de também terem encontrado um maior número de quartos posteriores que anteriores acometidos pelo *S. aureus*, observaram as maiores CCS entre os quartos posteriores infectados. De acordo com os autores, existe uma relação de interdependência entre os quartos mamários, de animais de um mesmo rebanho e de quartos de uma mesma vaca, que é tanto mais forte quanto maior a contagiosidade e patogenicidade do agente causador da infecção. Assim, a maior incidência do *S. aureus* sobre os quartos mamários de um mesmo rebanho e a maior susceptibilidade do(s) quarto(s) mamário(s) num mesmo animal frente ao patógeno estão diretamente relacionados à maior exposição da glândula ao agente (LAM et al., 1996). Obviamente, a relação de dependência entre a infecção pelo *S. aureus* e as CCS dos quartos anteriores e posteriores observadas no presente estudo poderia ser também atribuída à fatores ligados ao animal, como imunocompetência da vaca, e produção de leite da vaca (por todos os quartos, ou pelos quartos anteriores e posteriores, separadamente), de modo que, o modelo estatístico utilizado ([vaca + vaca*metade + tratamento*vaca(metade)]) contemplou tais fatores. Entretanto, a maior susceptibilidade dos quartos mamários não doentes e com baixa CCS, frente a presença do *S. aureus* no rebanho (ZADOKS et al., 2001) não foi considerada pelo modelo, fator especialmente importante nos dois rebanhos estudados, em que o posicionamento e a ordem em que as vacas eram ordenhadas poderiam influenciar a dinâmica de transmissão do patógeno, afetando a incidência de infecções sobre os quartos estudados e, conseqüentemente,

as CCS (ZADOKS et al., 2002). Dessa forma, parece claro que os efeitos específicos de contagiosidade e patogenicidade do *S. aureus* devem ser considerados e, uma vez que a dinâmica de transmissão do patógeno não foi acompanhada nesta pesquisa, não há margem para afirmações acerca da variação da CCS entre os quartos anteriores e posteriores relatado por Barkema et al. (1997).

Embora não diferentes estatisticamente, as médias do teor de gordura no leite dos quartos mamários anteriores e posteriores, positivos e negativos para o *S. aureus*, apresentaram notável diferença numérica. Uma vez conjecturada a hipótese de nulidade de efeito da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a composição de leite do quarto mamário afetado, poder-se-ia estar aceitando o erro do Tipo II, e o teste estatístico adotado estar falhando em rejeitar a hipótese de nulidade de efeito da infecção sobre o teor de gordura do leite das glândulas acometidas (PEREIRA, 2010), o que poderia estar relacionado ao tamanho da amostra considerada para a análise (5 e 9 pares de quartos anteriores e posteriores, respectivamente) e a amplitude de variância verificada entre as observações (EPM = 0,265 e EPM = 0,222, entre os quartos anteriores e posteriores, respectivamente). Decréscimos nas concentrações de gordura no leite eram esperadas, seja pela menor síntese do sólido como resultado do dano ao epitélio causado pelo patógeno (ALMEIDA et al., 1996) ou pela maior atividade lipolítica de enzimas leucocitárias (AZZARA; DIMICK, 1985), mas tal efeito não foi evidenciado estatisticamente no presente estudo. Maior do que a redução da síntese de gorduras pelas células do epitélio glandular é o decréscimo na produção de leite, o que levaria à um aumento virtual no teor de gordura (SCHULTZ, 1977). Entretanto, apesar da menor produção de leite dos quartos mamários anteriores com mastite subclínica pelo *S. aureus* (Tabela 9), o efeito citado por Schultz (1977) não foi observado no presente estudo ($P > 0,05$), para os quartos anteriores e posteriores. De fato, há contrariedades sobre o teor de gordura observado no leite de glândulas com mastite subclínica. Kitchen (1981) e Auldist et al. (1995) relataram leites com as menores concentrações de gordura nas mastites subclínicas, mas compararam o leite produzido por animais doentes e sadios, e não entre glândulas de um mesmo animal, diferente da abordagem adotada no presente estudo. Rogers et al. (1989), por outro lado, não encontraram diferenças nos teores de gordura, mas usaram o tanque como unidade amostral, e assim como Auldist et al. (1995), não consideraram o fator de variação “vaca” na análise, impossibilitando as comparações com os resultados obtidos no presente estudo.

A lactose também não sofreu a influência do status de infecção da glândula mamária e do posicionamento do quarto mamário afetado, e tanto quanto a gordura, notáveis diferenças

numéricas entre quartos mamários doentes e sadios foram observadas (4,25 e 4,30%, respectivamente, entre os anteriores; e 4,39 e 4,47%, entre os posteriores) com desvios médios baixos (EPM = 0,095 e EPM = 0,076, entre anteriores e posteriores, respectivamente). Bansal et al. (2005) obtiveram 4,61%, com desvio padrão = \pm 0,25, e 4,84%, com desvio padrão = \pm 0,18, e $P < 0,01$, mas compararam quartos sadios e doentes, respectivamente, entre animais, dissociando as diferenças individuais da análise e o patógeno que estivesse associado à infecção. Coulon et al. (2002) e Leitner et al. (2006) consideraram o patógeno, mas também não consideraram as diferenças individuais nem o posicionamento dos quartos mamários. Coulon et al. (2002) verificaram diferença ($P < 0,01$) entre os teores de lactose do leite de quartos com infecção subclínica pelo *S. aureus* (4,56%) e sadios (4,77%), e Leitner et al. (2006) não observaram diferença estatística entre os teores do sólido.

5.8 EFEITO DA MASTITE POR *S. AUREUS* SOBRE A PRODUÇÃO DO QUARTO MAMÁRIO AFETADO PELO MICRORGANISMO

Preliminar à avaliação do efeito da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a produção do quarto mamário, procedeu-se a análise para verificar as diferenças de produção esperadas entre as glândulas ipsilaterais anteriores e posteriores, independente do status sanitário, conforme previamente reportadas na literatura (MATTHEWS et al., 1941). Os resultados de produção dos quartos mamários ipsilaterais, segundo seu posicionamento, anterior ou posterior, independente do status sanitário, estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Produção de leite, em mililitros e gramas, produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, e produção de gordura e proteína, em quilograma dos quartos mamários ipsilaterais

	Quartos mamários				
	Anteriores	EPM ¹ (n) ²	Posteriores	EPM ¹ (n) ²	<i>P</i>
Produção de leite (mL)	1085,01	178,81 (10)	1707,81	173,57 (18)	0,0788
Produção de leite (g) ³	1117,56	184,18 (10)	1759,05	178,77 (18)	0,0788
FCM (g) ⁴	1234,94	217,67 (10)	1819,46	211,64 (18)	0,0991
Gordura (kg)	0,054	0,011 (10)	0,061	0,008 (18)	0,6367
Proteína (kg)	0,041	0,006 (10)	0,053	0,005 (18)	0,2387

¹ EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

² (n): Número de observações

³ Volume de leite, em mililitros, convertida para massa de leite, em gramas (JENSEN, 1995)

⁴ Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923)

Embora desejável que as produções de leite e de componentes lácteos fossem distribuídas uniformemente entre as metades anteriores e posteriores de modo à permitir uma melhor predição da habilidade leiteira de uma vaca (GAWALI; BHATNAGAR, 1975), a distribuição da produção em 40% e 60% entre as glândulas anteriores e posteriores, respectivamente, são fisiologicamente esperadas, em particular quando se tem como referência a produção de uma única ordenha da vaca (MATTHEWS et al., 1941) como foi o caso do presente estudo. Apesar das diferenças numéricas observadas entre as médias de produção das metades anteriores e posteriores terem sido percentualmente similares às diferenças fisiológicas documentadas na literatura (38,86% produzido pelas glândulas craniais e 61,13% pela glândulas caudais), a probabilidade de efeito do posicionamento não foi evidenciada ($P = 0,0788$) pelo teste estatístico adotado. Igualmente, Förstner et al. (2010) relataram maior quantidade de leite produzido pelos quartos posteriores de vacas, quando buscaram mensurar a variação diária dos quartos de nove vacas híbridas da raça Sueca Vermelha. Os animais utilizados no citado estudo, entretanto, estavam na 27^a semana de lactação (± 2 semanas), com 2,2 lactações ($\pm 1,8$ lactações) e produzindo, em média, 21,6 kg/dia ($\pm 1,7$ kg), diferente da presente pesquisa, em que os fatores dias em lactação (de 39 a 250 dias em lactação) e produção de leite (não houve critério de seleção para esse fator) não foram controlados.

A produção de leite ajustada para o percentual de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923) não foi diferente entre os quartos mamários anteriores e posteriores, apesar da diferença de 19,13% de leite produzido entre eles (1234,94 g e 1819,46 g, produzidos pelos quartos anteriores e posteriores, respectivamente). Mais uma vez, a não diferença estatística observada entre as produções médias dos quartos mamários anteriores e posteriores é possivelmente devida ao poder do teste estatístico em conservar a igualdade diante da vulnerabilidade do estudo baseado no tamanho da amostra (PEREIRA, 2010). Assim, procedeu-se a análise da influência do *S. aureus* sobre a produção de leite, em mililitros e gramas, da produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, e da produção de gordura e proteína, em quilograma, dos quartos mamários subclínicamente infectados pelo *S. aureus*, e os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Efeito do *S. aureus* sobre a produção de leite, em mililitros e gramas, da produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, e a produção de gordura e proteína, em quilogramas, de quartos mamários subclínicamente infectados

Variável	Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>				
	Positivo	Negativo	n^1	EPM ²	<i>P</i>
Produção de leite (mL)	1346,72	1428,10	14	172,52	0,0495
Produção de leite (g) ³	1405,66	1470,95	14	177,70	0,0495
FCM (g) ⁴	1476,47	1577,93	14	210,44	0,0109
Gordura (kg)	0,055	0,060	14	0,007	0,0076
Proteína (kg)	0,046	0,048	14	0,004	0,0559

¹ *n*: Número de observações, aos pares

² EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

³ Volume de leite, em mililitros, convertida para massa de leite, em gramas (JENSEN, 1995)

⁴ Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923)

Com exceção à produção de proteína, as outras variáveis de produção estudadas na presente investigação foram influenciadas pela condição subclínica de infecção pelo patógeno. A quantidade de leite produzida pelos quartos mamários com a infecção foi em média, 81,38 mililitros menor que as glândulas contralaterais sadias (1346,72 e 1428,10 mililitros, respectivamente), o que se traduz numa quantidade de leite 4,4% menor em relação ao teto em que se detectou o patógeno. A análise comparativa entre o quarto mamário doente e o contralateral hígido num mesmo animal permite quantificar os efeitos negativos da mastite subclínica sobre as variáveis de produção e composição do leite com nível de confiança alto, mesmo com um número de unidades amostrais relativamente pequeno, neutralizando o efeito de fatores individuais, ou aqueles relacionados com o ambiente ou manejo (BARKEMA et al., 1997). A partir dessa abordagem, foi possível afirmar que a mastite subclínica pelo *S. aureus* determinou a menor produção de leite nas glândulas acometidas (1405,66 g e 1470,95 g, com $P = 0,0495$, produzidos pelas glândulas inflamadas e sadias, respectivamente), independente de seu posicionamento, anterior ou posterior. Diferenças de produção de 780 g de leite por ordenha (TESFAYE; REGASSA; KELAY, 2010) e de 760 kg por lactação (NATZKE et al., 1972) entre quartos mamários sadios e com a infecção subclínica pelo *S. aureus* já foram registradas, embora perdas relacionadas à infecção pelo patógeno podem variar em função da categoria animal em estudo. Whist et al (2009) observaram que múltiparas em que a bactéria foi isolada em um quarto mamário produziram, em média, 94 kg e 161 kg de leite a menos que os animais hígidos em segunda, e a partir da terceira lactação, respectivamente. E nas múltiparas das quais mais do que dois quartos mamários foram isolados o *S. aureus*, as perdas chegaram a 390 kg de leite comparadas aos animais na mesma categoria durante uma

lactação de 305 dias (WHIST et al., 2009). No mesmo estudo Whist et al. (2009), demonstraram que primíparas com isolamento positivo para o *S. aureus* apresentaram curva de lactação similar àquelas com diagnóstico negativo para o patógeno, com exceção das novilhas das quais mais que dois quartos mamários o patógeno foi isolado. Já Paradis et al. (2010), apesar de terem utilizado o leite composto das primíparas para análise ao invés do leite individual dos quartos, não estimaram diferenças significativas de produção a partir de modelos preditivos entre os animais acometidos pela infecção subclínica pelo *S. aureus* no primeiro mês de lactação, quando comparadas às contemporâneas híginas. As diferenças observadas entre as perdas de produção de leite na presente pesquisa e aos demais estudos citados poderiam ser devido à seleção não distinta dos animais aqui utilizados no que se refere ao número de partições/lactações para seleção. Parece claro que fatores como partição, número de lactações, e estágio da lactação do indivíduo sejam fatores que influenciam diretamente a susceptibilidade dos quartos frente ao *S. aureus* (ZADOKS et al., 2001), uma vez que Barkema et al. (1997) observaram um número maior de vacas sem qualquer um dos quatro quartos infectados e vacas com múltiplos quartos infectados do que as expectativas calculadas para as mastites subclínicas devidas à patógenos contagiosos. Portanto, devido à heterogeneidade dos animais utilizados no presente estudo, não foi possível determinar um estimador capaz de inferir sobre a magnitude de perdas de produção decorrentes da infecção subclínica pelo *S. aureus* a partir dos resultados obtidos.

A patogenicidade da cepa de *S. aureus* envolvida em infecções subclínicas parece também contribuir para a cronicidade da doença e a magnitude das perdas de produção decorrentes dela. O *S. aureus* VL-8407, cepa de campo utilizada por Shoshani et al. (2000) para infectar experimentalmente quartos mamários de 4 primíparas e oito múltiparas, estabeleceu o quadro subclínico da mastite nos quartos inoculados, mas não determinou diferenças na produção de leite das glândulas acometidas durante os 50 dias pós inoculação. Os autores (SHOSHANI et al., 2000) atribuíram a ausência de efeito à baixa virulência da cepa ou à maior resistência dos animais, todos com 150 dias em lactação, utilizados no estudo. Anderson e Lyman (2006), entretanto, verificaram as maiores perdas de leite e maiores CCS dos rebanhos cujas cepas isoladas mantinham-se por 15 anos.

Apesar da equação de Gaines e Davidson (1923) ter sido primeiramente desenvolvida para o balanceamento de energia da alimentação da vaca leiteira com base na energia do leite por ela produzida, o modelo passou a ser utilizado pela cadeia leiteira como referencial de produção, industrialização e precificação da matéria-prima (BROG, 1970; Dairy Herd Improvement, 2011). Assim, após a conversão dos dados de produção de leite para gramas

(JENSEN, 1995) e ajuste para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923) [$3,5\% \text{ FCM} = (\text{massa de leite} \times 0,432) + (\text{massa de gordura} \times 16,216)$], foi possível observar que a média de produção ajustada das glândulas com a mastite também foi menor ($P = 0,01$) que a produção média registrada nas glândulas não infectadas (1476,47 g e 1577,93 g, respectivamente), diferença que determinou aproximadamente 7% à menos de leite com o teor de 3,5%. Dessa maneira, ficam margens para a reinterpretação do significado prático dessa diferença. Se anteriormente foi observada ausência de diferença entre os teores médios de gordura (3,76% e 3,93%, glândulas doentes e sadias, respectivamente, com $P = 0,1485$, Tabela 5) do total de leite produzido pelos quartos mamários com a infecção subclínica pelo *S. aureus* e sadios (1346,72 e 1428,10 mililitros, respectivamente, com $P = 0,0495$, Tabela 8), mesmo que haja compensação do volume de leite que deixou de ser produzido pelo quarto mamário doente, pela glândula hígida (SWETT et al., 1938), esse efeito compensatório é apenas parcial (FORSTER et al., 1967; MEIJERING et al., 1978; HORTET; SEEGERS, 1998) e, portanto, as perdas do leite com teor médio de gordura ajustado para o percentual de 3,5% seriam apenas parcialmente compensadas. Para complementação dessa análise, nas glândulas em que o patógeno foi isolado, uma produção média menor de gordura foi observada ($P = 0,0076$) em relação àquelas com isolamento negativo para o *S. aureus* (0,055 versus 0,060 kg), independente do seu posicionamento. Daí, supor-se-ia que tais diferenças implicam em considerações importantes quanto ao custo total da manufatura de produtos advindos de uma matéria-prima com quantidades menores de gordura, uma vez que os custos para o processamento de um dado volume de leite é o mesmo, independente de qual seja o teor de sólidos nele contido (HILLERS et al., 1980). Segundo esses autores (HILLERS et al., 1980), transporte, recepção na plataforma, separação, evaporação e secagem, pasteurização, cozimento da massa para produção de queijos, e limpeza determinam os mesmo custos para o volume de leite em questão, independente de sua composição. Assim, tanto menor é o custo total de processamento quanto maior é a quantidade do produto advinda desse dado volume.

Uma vez que já ter sido relatada forte interdependência entre quartos mamários, elevada CCS e presença de infecção pelo *S. aureus* (BARKEMA et al., 1997), no presente estudo foi premente avaliar a influência da infecção subclínica pelo patógeno sobre as variáveis de produção do quarto mamário doente, comparando-o com seu contralateral sadio, de acordo com o seu posicionamento, anterior ou posterior, com os resultados apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Efeito da infecção subclínica por *S. aureus* sobre a produção de leite, em mililitros e gramas, da produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, e da produção de gordura e proteína, em quilogramas, segundo o posicionamento, anterior ou posterior, dos quartos mamários contralaterais

Variável	Quartos mamários anteriores					Quartos mamários posteriores					Interação ⁵
	Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>					Status de infecção pelo <i>S. aureus</i>					
	Positivo	Negativo	<i>n</i> ¹	EPM ²	<i>P</i>	Positivo	Negativo	<i>n</i> ¹	EPM ²	<i>P</i>	
Produção de leite (mL)	1026,68	1143,34	5	180,36	0,0272	1702,76	1712,86	9	174,45	0,7782	0,0921
Produção de leite (g) ³	1057,47	1177,64	5	185,77	0,0272	1753,84	1764,25	9	179,69	0,7782	0,0921
FCM (g) ⁴	1154,85	1315,03	5	219,45	0,0120	1798,09	1840,83	9	212,66	0,3210	0,1130
Gordura (kg)	0,050	0,058	5	0,011	0,0107	0,060	0,062	9	0,008	0,2154	0,1270
Proteína (kg)	0,039	0,043	5	0,006	0,0373	0,053	0,053	9	0,005	0,6958	0,13

¹ *n*: Número de observações, aos pares

² EPM: Erro padrão da média dos quadrados mínimos

³ Volume de leite, em mililitros, convertida para massa de leite, em gramas (JENSEN, 1995)

⁴ Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923)

⁵ Interação: Probabilidade de efeito da interação entre metade (anterior ou posterior) e infecção subclínica pelo *S. aureus*

O delineamento em parcelas subdividas e a análise a partir do modelo misto possibilitaram verificar que não houve probabilidade de efeito de interação ($P > 0,05$) entre a infecção subclínica do quarto mamário pelo *S. aureus* e o posicionamento do quarto mamário, anterior ou posterior, influenciando qualquer das variáveis de produção estudadas. Entretanto, pôde-se observar que a infecção subclínica pelo patógeno nos quartos mamários anteriores determinou diferenças ($P < 0,05$) entre as médias de todas as variáveis de produção analisadas comparadas aos seus respectivos contralaterais isentos da mastite. Tal influência, entretanto, não foi evidenciada nas glândulas posteriores acometidas pela bactéria ($P > 0,05$). A diferença média de produção de leite verificada entre as glândulas anteriores, sadias e acometidas pela mastite subclínica estafilocócica foi de 120,17 g de leite (1177,64g versus 1057,47g, glândulas sadias e com mastite, respectivamente, com $P = 0,0272$). Ao ajustar a produção de leite para o teor relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923), verificou-se diferença ($P = 0,0120$) de 160,18 g de leite produzido pelo quarto infectado em relação ao sadio (1154,85 versus 1315,03 g). As produções de gordura e de proteína também foram menores entre os quartos anteriores com mastite subclínica pelo *S. aureus*. A diferença de produção de gordura foi de 14% (0,058 kg versus 0,050 kg, entre os quartos anteriores e posteriores, respectivamente, com $P = 0,0107$), e a de proteína 9,35% maior (0,043kg versus 0,039kg, entre os quartos anteriores e posteriores, respectivamente, com $P = 0,0373$). É possível verificar, a partir da análise conjunta das diferenças de produção de leite (120,17 g) e da produção de leite ajustada para o teor médio de gordura de 3,5% (160,18 g) dos quartos anteriores, que não somente o volume de leite secretado pela glândula doente foi menor, mas também foi acompanhado da menor produção de gordura, pois ajustada a produção de leite para o teor de gordura de 3,5%, verificou-se a maior diferença de volume produzido entre os quartos (160,18 g) do que quando somente utilizado o volume ou massa do leite como referência de medida para a produção de leite da glândula. Tal diferença representa perdas significativas para o rendimento industrial quando do processamento dessa matéria-prima, como já mencionado anteriormente. Revisando sobre os impactos da mastite clínica na produção e composição do leite bovino, Hortet e Seegers (1998) enumeraram trabalhos que relataram menor produção de gordura (WOOD; BOOTH, 1983; MACMILLAN et al., 1983; HOUBEN et al., 1993; MYLLYS; RAUTALA, 1995) e proteína (WOOD; BOOTH, 1983; HOUBEN et al., 1993; MYLLYS; RAUTALA, 1995), sem que fosse possível para aqueles autores (HORTET; SEEGER, 1998) inferir se a magnitude das perdas na produção de

gordura e proteína eram de fato maiores ou menores que aquelas observadas nas produções de leite.

Diferente do resultado obtido no presente estudo, o posicionamento dos quartos mamários foi enumerado como um fator de risco para a incidência e prevalência de mastites clínica e subclínica (MILTENBURG et al., 1996; BARKEMA et al., 1997; BUSATO et al., 2000). Independentemente do patógeno envolvido com a doença, contagioso ou ambiental, e da apresentação, clínica ou subclínica da mastite, Miltenburg (1996), Barkema et al. (1997) observaram maior prevalência de infecções nas glândulas posteriores por meio de análise univariada, e Busato et al. (2000), nos quartos anteriores, usando modelo multivariado num estudo de corte transversal (ZADOKS et al., 2001). Zadoks et al. (2001) observaram prevalência do *S. aureus* entre os quartos anteriores quando utilizaram análise univariada para categorização das variáveis, diferença que deixou de existir quando os fatores de variação foram incluídos no modelo para análise multivariada do estudo longitudinal realizado pelos autores. Naquele estudo (ZADOKS et al., 2001), buscando enumerar os fatores de risco em nível de vaca e de quartos mamários associados à infecção pelo *S. aureus* e *Streptococcus uberis*, os autores incluíram fatores independentes de variação em nível de animal (parição, produção, estágio da lactação, eventos clínicos importantes e CCS) no modelo multivariado que adotaram. Em nível de quarto mamário, os autores (ZADOKS et al., 2001) incluíram no modelo o posicionamento dos quartos, histórico de mastites anteriores no quarto mamário e o patógeno relacionado ao caso. No presente estudo, embora tenha sido uma investigação de corte transversal, a proposta foi a de avaliar a influência da mastite subclínica pelo *S. aureus* sobre a produção do quarto mamário e, para tanto, fatores de ponderável influência sobre a variável resposta foram considerados a partir da inclusão do fator de variação individual “vaca”. O modelo multivariado utilizado não contemplou a CCS (GREEN et al., 2006) do quarto mamário como variável de confusão de modo a permitir que a influência da resposta inflamatória sobre a produção de leite (NG-KWAI-HANG et al., 1984; HORTET; SEEGERS et al., 1998) fosse separada dos efeitos do patógeno *per se* sobre o tecido epitelial mamário (ALMEIDA et al., 1996; HÉBERT et al., 2000; YOUNIS et al., 2003), e conseqüentemente, avaliar a contribuição de cada um desses fatores, separadamente, sobre produção do quarto afetado. Tal fato poderia explicar a diferença ($P < 0,05$) de produção de leite entre os quartos anteriores sadios e doentes, e a não diferença ($P > 0,05$) entre os quartos posteriores sadios e doentes, visto que a média da CCS dos quartos mamários anteriores com a infecção subclínica foi de 935.000 CS/mL (ou $5,97 \log_{10}\text{CS/mL} \pm 0,133$), e de 460.000 CS/mL (ou $5,66 \log_{10}\text{CS/mL} \pm 0,076$) nas glândulas posteriores com isolamento do patógeno. Dessa maneira,

parece ser compreensível que no presente estudo não foi observado efeito decorrente da interação entre o patógeno e o posicionamento da glândula ($P > 0,05$) sobre as variáveis analisadas (Tabela 9), uma vez que a diferença de produção de leite pareceu estar relacionada com a magnitude da resposta inflamatória frente ao patógeno, e não com o patógeno *per se*. Embora Ward e Schultz (1972) e Meijering et al. (1978) tenham utilizado metodologia diferente da que foi utilizada no presente estudo para determinar a CCS em suas investigações (separação de DNA por membrana), verificaram reduções médias de produção maiores que 1% nos quartos mamários para cada 400.000 CS/mL nas infecções subclínicas com faixa de contagem de até 600.000 CS/mL (WARD; SCHULTZ, 1972), e perdas progressivamente maiores à medida que as CCS aumentavam (MEIJERING et al., 1978). Nos dois estudos, entretanto, a CCS foi a variável independente, sem que fossem enumerados os patógenos que desencadearam a resposta inflamatória. Incluindo primeiramente a presença do *S. aureus* em duas categorias de contagem (menor ou maior que 1.500 UFC/mL) no modelo estatístico para analisar sua influência na produção de leite da vaca, Reksen et al. (2007) não encontraram variações significativas na variável resposta, mas probabilidade de efeito $P \leq 0,05$ quando a CCS do animal foi incluído na análise. Assim, na análise multivariada do presente estudo, mesmo que reconhecidos os efeitos da resposta inflamatória sobre a produção de leite, e da patogenia do *S. aureus* sobre a produção de leite, há que se reconhecer a relação de dependência existente entre a infecção pelo patógeno, dano ao parênquima secretor mamário e aumento de CCS (HARMON, 1994) - de modo que não é o aumento da CCS que leva à infecção pelo *S. aureus*, e sim a infecção pelo *S. aureus* é que leva ao aumento da CCS (ZADOKS et al., 2001) - e analisar o efeito da “infecção subclínica ocasionada pelo *S. aureus*” sobre as variáveis de produção de forma conjunta, sem a possibilidade de dissociar um do outro.

5.9 ESTIMATIVA DA CORRELAÇÃO ENTRE AS CONTAGENS DO *S. AUREUS*, AS CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE, GORDURA, PROTEÍNA BRUTA, PROTEÍNA VERDADEIRA E CASEÍNA, E A PRODUÇÃO DE LEITE DO QUARTO MAMÁRIO

As estimativas de correlação entre as contagens do patógeno e os teores de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira, caseína, e as variáveis de produção de leite e de seus componentes estão apresentadas na tabela 10. Em função da diferença entre contagens de

S. aureus obtidas pelos métodos de quantificação utilizados no presente estudo, os dados foram analisados tendo como variável independente a contagem do patógeno ora obtida pelo método contagem em placas, ora estimada pelo método de qPCR.

Tabela 10 - Correlações entre as contagens de *S. aureus*, obtidas pelos métodos de referências e de qPCR, as concentrações de lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira, caseína, da produção de leite, produção de leite corrigida para a concentração de 3,5% de gordura, e da produção de gordura e proteína em amostras de leite de 43 quartos mamários subclínicamente infectados pelo patógeno

Variável	UFC/mL [Referência] ¹		UFC/mL [qPCR] ²	
	r	P	r	P
Lactose (%)	0,032	0,8360	0,42	0,0051
Gordura (%)	0,46	0,0016	0,09	0,5640
Proteína bruta (%)	-0,17	0,2623	-0,21	0,1643
Proteína verdadeira (%)	-0,16	0,2979	-0,15	0,3317
Caseína (%)	-0,14	0,3559	-0,035	0,8194
Produção de leite (mL)	0,28	0,069	0,275	0,075
Produção de leite (g) ³	0,28	0,069	0,275	0,075
FCM (g) ⁴	0,41	0,006	0,31	0,043
Gordura (kg)	0,49	0,001	0,319	0,037
Proteína (kg)	0,25	0,16	0,245	0,113

¹ Contagem de *S. aureus* viáveis, em log₁₀UFC/mL, determinado pela método de contagem em placas (3M Petrifilm® Staph Express Count Plate)

² Contagem de *S. aureus*, em log₁₀UFC/mL, estimado pelo método de qPCR

³ Volume de leite, em mililitros, convertida para massa de leite, em gramas (JENSEN, 1995)

⁴ Produção de leite ajustada para o percentual relativo de gordura de 3,5% (GAINES; DAVIDSON, 1923)

Os teores de gordura apresentaram aumento linearmente responsivo ao número de *S. aureus* viáveis das amostras de leite analisadas ($r = 0,46$, $P = 0,0016$), embora somente 21,5% da variância dos teores de gordura possam ser explicados pela variância observada entre as contagens do patógeno. Também com baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 18,1\%$), aumentos na concentração de lactose foram observados ($r = 0,42$, com $P = 0,0051$) à medida que o número de UFC/mL de *S. aureus* estimado pelo qPCR aumentou nas amostras de leite. Não há relatos na literatura indexada que correlacionem as alterações nas variáveis de composição do leite de quartos mamários com as contagens de patógenos presentes na glândula.

A produção de leite corrigida para o teor de gordura de 3,5 % se correlacionou positivamente com o número de *S. aureus* viáveis ($r = 0,41$, com $P = 0,006$) e totais ($r = 0,31$,

com $P = 0,043$), embora os coeficientes de determinação denotem a baixa capacidade desta relação explicar as variações de produção a partir do número de células do patógeno, viáveis ou totais, na amostra de leite (17,0 e 9,5 %, respectivamente). Correlação linear positiva entre a produção de gordura e o número de bactérias enumeradas pela contagem em placas também foi observada ($r = 0,49$, com $P = 0,001$), embora o R^2 determinado por essa correlação tenha sido de apenas 24,3%. Também com baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 10,2$ %), verificou-se correlação linear positiva entre a produção de gordura e o número total do gene *nuc* na amostra ($r = 0,31$, com $P = 0,037$).

Antes do diagnóstico microbiológico, Gröhn et al. (2004) observaram que vacas com mastite clínica pelo *S. aureus* produziam maior quantidade de leite comparadas aos animais do mesmo rebanho sem infecção. Em seguida, entretanto, verificaram diminuição da produção, à medida que a infecção tendia à cronicidade.

Parece claro que variações no número de UFC/mL de *S. aureus* não só reflete flutuações na eliminação do patógeno no leite de glândulas por ele infectadas (SEARS et al., 1990), mas também o grau de severidade e cronicidade da infecção intramamária. Reksen et al. (2007) categorizaram as contagens de *S. aureus* para avaliar o efeito em dois níveis de contagem do *S. aureus* (ricas e esparsas, com < 1.500 UFC/mL e > 1.500 UFC/mL, respectivamente) de amostras de infecções subclínicas, sobre a produção de leite. Verificaram perdas de produção de leite em ambos níveis, em maior ou menor magnitude, e com padrões distintos, em função do número de parições dos animais sob análise. E com resultados particularmente similares aos obtidos no presente estudo, verificaram também perdas maiores entre as primíparas cujas amostras de leite geraram contagens esparsas do patógeno, comparadas às contemporâneas com eliminação de células > 1.500 UFC/mL.

A despeito da aparente obviedade existente entre a contagem do *S. aureus* presente na infecção e o grau de acometimento e severidade da doença (REKSEN et al., 2007), situações inversas foram observadas no presente estudo: maiores contagens do patógeno, viáveis ou totais, nas amostras em que os maiores teores de sólido (lactose e gordura) e as maiores produções de leite (produção de leite ajustada para 3,5% de gordura, e produção de gordura) foram registradas. Porém, apesar da significativa probabilidade estatística ($P < 0,05$), a contagem do *S. aureus* nas amostras de leite não pareceu ter sido o fator que mais adequadamente justificou as variações observadas ($R^2 > 50$ %). Assim, parece claro que outras variáveis devem ser incluídas em estudos futuros para melhorar a compreensão do efeito da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a composição e produção do leite bovino.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

A especificidade analítica do método de qPCR para a detecção do *Staphylococcus aureus* em amostras de leite é de 100% frente aos patógenos causadores de mastite *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, os estafilococos coagulase-negativa, e as espécies coagulase-positiva *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*. O método de qPCR aplicado à detecção de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 em amostras de leite apresenta sensibilidade analítica com limite de detecção para faixa de 10 UFC/mL à $4,2 \times 10^6$ UFC/mL. O método de qPCR utilizado para a detecção e quantificação do *S. aureus* ATCC 29213 é replicável. Já em amostras de leite conservadas com bronopol provenientes de quartos mamários subclínicamente infectados, o *S. aureus* pode ser detectado pelo método de qPCR, mas não pode ser quantificado, pois não fornece resultados equivalentes aos obtidos pelo método de referência, o que impossibilita a utilização da técnica em substituição à contagem do patógeno em placas, mas que após adequações da equação de regressão aqui estabelecida, poderia ser utilizada para a determinação da quantidade total do patógeno, independente da viabilidade do organismo presente na amostra.

Diante da sensibilidade e especificidade diagnósticas do método para a detecção do *S. aureus* em amostras de leite naturalmente contaminadas, e de sua capacidade em determinar a contagem de células somáticas de forma equivalente à técnica usualmente adotada para tal, podemos inferir, a partir dos resultados por nós obtidos, que o método pode ser utilizado para diagnosticar a presença deste patógeno e determinar a CCS em amostras de leite oriundas de quartos mamários subclínicamente infectados.

A contagem de células somáticas em amostras de leite de quartos mamários subclínicamente infectados depende da contagem de *S. aureus* viáveis, mas verificamos uma fraca relação, linear e inversamente proporcional, entre o número total de células do patógeno e a contagem de células somáticas, de modo que, possivelmente, em virtude de fatores ligados à interação parasita e hospedeiro não investigados no presente estudo, outros fatores, além da presença da infecção subclínica pelo *S. aureus*, parecem ter maior contribuição para a tal correlação.

No particular processo infeccioso subclínico estudado, observamos, invariavelmente, aumento da contagem de células somáticas dos quartos mamários, mas nenhuma alteração nas

concentrações dos demais componentes do leite das glândulas doentes. A doença, entretanto, diminuiu a produção de leite e de gordura dos quartos mamários anteriores acometidos pela infecção, sem que houvesse relação entre o posicionamento da glândula e as perdas de produção observadas.

Houve uma fraca relação de dependência entre a concentração de lactose, a produção de gordura e de leite com produção ajustada para o teor de 3,5% de gordura, e o número de *S. aureus* presentes na amostra de leite. Além dessa tênue interdependência, apenas uma pequena parcela dessas variações de composição e produção de leite, observadas no processo infeccioso subclínico estudado, pode ser atribuída ao número de células, viáveis (que em nosso estudo variaram de $3,9 \times 10^3$ UFC/mL à 50×10^3 UFC/mL) ou não do patógeno na glândula mamária, de modo que a melhor compreensão da dinâmica da doença e seus efeitos sobre a produção da glândula mamária bovina dependem de outras investigações.

REFERÊNCIA

ALMEIDA, R. A.; MATTHEWS, K. R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1021-1026, 1996.

ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman and Hall, 1991. 611 p.

ANDERSON, M. Factors affecting the distribution of lipoprotein lipase activity between serum and casein micelles in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 49, n. 01, p. 51-59, 1982.

ANDERSON, S.; DE BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; EPERON, I. C.; SANGER, F.; YOUNG, I. G. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 156, n. 4, p. 683-717, 1982.

ANDERSON, K. L.; LYMAN, R. L. Long-term persistence of specific genetic types of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* on three dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4551-4556, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 18. ed. AOAC International, Gaithersburg, 2003.

ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; PERSSON WALLER, K. An improved method to culture *Staphylococcus aureus* from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1534-1538, 2010.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MCDOWELL, G. H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

AZZARA, C. D.; DIMICK, P. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 12, p. 3171-3175, 1985.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 144-152, 2005.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; GALLIGAN, D. T.; BEIBOER, M. L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1592-1599, 1997.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BARRIO, M. B.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Milk complement and the opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates by bovine neutrophils. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2003.

BARTLETT, P. C.; VAN WIJK, J.; WILSON, D. J.; GREEN, C. D.; MILLER, G. Y.; MAJEWSKI, G. A.; HEIDER, L. E. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1561-1572, 1991.

BELÁK, S.; THORÉN, P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 1, n. 4, p. 434-443, 2001.

BENGTSSON, B. R.; UNNERSTAD, H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 142-149, 2009.

BERGLUND, I.; PETTERSSON, G.; ÖSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter milking for improved detection of increased SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 427-432, 2007.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **International Journal of Nursing Studies**, v. 47, n. 8, p. 931-936, 2010.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. The environment and mastitis. **In Practice**, v. 22, n. 7, p. 382-394, 2000.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2. ed. London: CABI Publisher, 2010. 266p.

BOSS, R.; NASKOVA, J.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Mastitis diagnostics: quantitative PCR for *Staphylococcus aureus* genotype B in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 128-137, 2011.

BRAKSTAD, O. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654-1660, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51: Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite cru refrigerado. Brasília: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002. sec. 1, p. 13.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas

em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BROG, R. A. Is fat-corrected milk sufficient? **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 8, p. 1137-1141, 1971.

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

BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHÄLLIBAUM, M.; BLUM, J. W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 3-4, p. 205-220, 2000.

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

BYSTRONÍ, L.; BANIA, J.; LIS, E.; MOLEND, J.; BEDNARSKI, M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cow's milk. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 53, p. 59-63, 2009.

CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 4, p. 849-850, 2007.

CAPURRO, A. **Diagnostic and epidemiological studies of staphylococci in bovine mastitis**. 2009. 59 f. Thesis (Doctoral thesis) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, Uppsala, 2009.

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

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 434-439, 2010.

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

COULON, J. B.; GASQUI, P.; BARNOUIN, J.; OLLIER, A.; PRADEL, P.; POMIES, D. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. **Animal Research**, v. 51, n. 5, p. 383-393, 2002.

CRUPPE, L. H.; FOE, F. H.; FRANCO, F.; VASCONCELOS, C. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 47., 2008, New Orleans, Louisiana. **Anais...** Washington: National Mastitis Council, 2008. p. 218-219.

DALEY, M. J.; OLDHAM, E. R.; WILLIAMS, T. J.; COYLE, P. A. Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced

Staphylococcus aureus mastitis in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 3, p. 6, 1991.

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

DENIS, M.; WEDLOCK, D. N.; LACY-HULBERT, S. J.; HILLERTON, J. E.; BUDDLE, B. M. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 3, p. 132-140, 2009.

DETILLEUX, J. C. Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 157-164, 2009.

DINSMORE, R. P. Biosecurity for mammary diseases in dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 115-131, 2002.

DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Rebhun's diseases of dairy cattle**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier Health Science, 2008. 686 p.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 335-357, 2002.

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cell counts in bovine milk. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 23, n. 4, p. 119-125, 1982.

DOYMAZ, M. Z.; SORDILLO, L. M.; OLIVER, S. P.; GUIDRY, A. J. Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentrations in milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, n. 1, p. 87-93, 1988.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL, F. R.; SMITH, T. F. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FOOD AND DRUG ASSOCIATION. **Guidance for Industry and FDA Staff - Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests**. Rockville, MD, USA: U.S. Department of Health and Human Services - Center for Devices and Radiological Health, 2007. p. 39

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, 2006.

FERREIRO, L.; FERREIRO, C. L. R.; BANGEL JR., J. J. Mastite bovina na grande Porto Alegre, RS – Brasil. 1. Agentes etiológicos isolados durante o período 1982-1985. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 13, p. 81-88, 1985.

FONSECA, I. **Perfil da expressão de genes relacionados à resistência à mastite em bovinos leiteiros**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; ÅKERSTEDT, M.; ANDRÉE, L.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3569-3577, 2010.

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

FORSTER, T. L.; ASHWORTH, U. S.; LUEDECKE, L. O. Relationship between California Mastitis Test reaction and production and composition of milk from opposite quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 5, p. 675-682, 1967.

FOURNIER, C.; KUHNERT, P.; FREY, J.; MISEREZ, R.; KIRCHHOFER, M.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 439-448, 2008.

FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 82-88, 2009.

FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 475-487, 1993.

FOX, L. K.; GERSHMAN, M.; HANCOCK, D. D.; HUTTON, C. T. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing – the effect of milking time hygiene practices. **Cornell Veterinary Medicine**, v. 81, p. 183-193, 1991.

FROST, A. J.; WANASINGHE, D. D.; WOOLCOCK, J. B. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. **Infection and Immunity**, v. 15, n. 1, p. 245-253, 1977.

GAINES, W. L.; DAVIDSON, F. A. **Relation between percentage fat content and yield of milk**: correction of milk yield for fat content. Urbana, Illinois: University of Illinois Agricultural Experiment Station, 1923. v. 245, 598 p. (University of Illinois Agricultural Experimental Station Bulletin).

GAWALI, S. R.; BHATNAGAR, D. S. Variations in individual quarter yields in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 28, n. 3, p. 225-227, 1975.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DEGREGORIO, O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1224-1227, 2000.

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

GONZALEZ, R. N.; JASPER, D. E.; KRONLUND, N. C.; FARVER, T. B.; CULLOR, J. S.; BUSHNELL, R. B.; DELLINGER, J. D. Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 648-660, 1990.

GOTO, M.; TAKAHASHI, H.; SEGAWA, Y.; HAYASHIDANI, H.; TAKATORI, K.; HARA-KUDO, Y. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 90-96, 2007.

GRABER, H. U.; CASEY, M. G.; NASKOVA, J.; STEINER, A.; SCHAEREN, W. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 4661-4669, 2007.

GRABER, H. U.; NASKOVA, J.; STUDER, E.; KAUFMANN, T.; KIRCHHOFER, M.; BRECHBÜHL, M.; SCHAEREN, W.; STEINER, A.; FOURNIER, C. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. **Journal Of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1442-1451, 2009.

GREEN, L. E.; SCHUKKEN, Y. H.; GREEN, M. J. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 1-2, p. 74-89, 2006.

GRESHAM, H. D.; LOWRANCE, J. H.; CAVER, T. E.; WILSON, B. S.; CHEUNG, A. L.; LINDBERG, F. P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. **Journal Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3713-3722, 2000.

GRÖHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZÁLEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3358-3374, 2004.

GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P.; SQUIGGINS, K. E.; ERBE, E. F.; DOWLEN, H. H.; HAMBLETON, C. N.; BERNING, L. M. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3360-3369, 1991.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

- HASSANIN, A.; DOUZERY, E. J. P. The tribal radiation of the family bovidae (*Artiodactyla*) and the evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, n. 2, p. 227-243, 1999.
- HAVERI, M.; TAPONEN, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; SALMENLINNA, S.; PYÖRÄLÄ, S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 959-961, 2005.
- HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SENECHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACE, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, n. 1, p. 57-62, 2000.
- HEIN, I.; JORGENSEN, H. J.; LONCAREVIC, S.; WAGNER, M. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 554-563, 2005.
- HEIN, I.; LEHNER, A.; RIECK, P.; KLEIN, K.; BRANDL, E.; WAGNER, M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p., 2001.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.
- HILLERS, J. K.; NIELSEN, V. H.; FREEMAN, A. E.; DOMMERHOLT, J.; DEITER, R.E. Value of fat and protein in producer milk. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 2, p. 322-327, 1980.
- HIROSE, K.; KAWASAKI, Y.; KOTANI, K.; TANAKA, A.; ABIKO, K.; OGAWA, H. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 6, p. 691-693, 2001.
- HOBLET, K. H.; BAILEY, J. S.; PRITCHARD, D. E. Coagulase positive staphylococcal mastitis in a herd with low somatic cell counts. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 6, p. 777-780, 1988.
- HOGAN, J. S.; GONZALEZ, R. N.; HARMON, R. J.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; PANKEY, J. W.; SMITH, K. L. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999.
- HOLDAWAY, R.; HOLMES, C.; STEFFERT, I. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows – 1: The effects of bacterial infection, stage of lactation and age of cow on eight parameters in foremilk from individual quarters, with an initial study of differences between milk fractions. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 2, p. 64-71, 1996.

HORTET, P.; SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. **Veterinary Research**, v. 29, n. 6, p. 497-510, 1998.

HOUBEN, E. H. P.; DIJKHUIZEN, A. A.; VAN ARENDONK, J. A. M.; HUIRNE, R. B. M. Short- and Long-Term Production Losses and Repeatability of Clinical Mastitis in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2561-2578, 1993.

HUIJPS, K.; LAM, T.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 113-120, 2008.

HUYGENS, F.; INMAN-BAMBER, J.; NIMMO, G. R.; MUNCKHOF, W.; SCHOONEVELDT, J.; HARRISON, B.; MCMAHON, J. A.; GIFFARD, P. M. *Staphylococcus aureus* genotyping using novel real-time PCR formats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3712-3719, 2006.

IRWIN, D.; KOCHER, T.; WILSON, A. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.

JÁNOSI, S.; BALTAI, Z. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 173-183, 2004.

JAYARAO, B. M.; DORE, J. J. E.; BAUMBACH, G. A.; MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and Restriction-fragment-length-polymorphism analysis of 16s ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2774-2778, 1991.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3561-3573, 2004.

JENSEN, R. G. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995. 919 p.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; HØGÅSEN, H. R.; RØRVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 158-166, 2005.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, Á.; VAN BLOOIS, L.; VAN DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J. A. MRSA Transmission between Cows and Humans. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 4, p. 630-632, 2007.

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

KELLY, A. L.; O'FLAHERTY, F.; FOX, P. F. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 563-572, 2006.

KIM, C. H.; KHAN, M.; MORIN, D. E.; HURLEY, W. L.; TRIPATHY, D. N.; KEHRLI, M.; OLUOCH, A. O.; KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 74-83, 2001.

KITCHEN, B. J. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

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

KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; SALMIKIVI, L. Field comparison of real-time PCR and conventional bacterial culturing in bovine mastitis testing. In: IDF MASTITIS CONFERENCE, 5., 2010, Christchurch, New Zealand. **Anais...** Brussels: International Dairy Federation, 2010. p. 486-488.

LAM, T. J. G. M.; VAN WUIJCKHUISE, L. A.; FRANKEN, P.; MORSELT, M. L.; HARTMAN, E. G.; SCHUKKEN, Y. H. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n. 10, p. 4, 1996.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 629-645, 2003.

LEIGH, J. A.; LINCOLN, R. A. *Streptococcus uberis* acquires plasmin activity following growth in the presence of bovine plasminogen through the action of its specific plasminogen activator. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, n. 1, p. 123-129, 1997.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648-654, 2006.

LOEFFELHOLZ, M.; DENG, H. PCR and its variations. In: TANG, Y.-W.; STRATTON, C. W. (Ed.). **Advanced techniques in diagnostic microbiology**. New York: Springer, USA, 2006. p. 166-183.

LUDBROOK, J. Statistical techniques for comparing measurers and methods of measurement: A critical review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 7, p. 527-536, 2002.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 556-562, 2000.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 966-969, 2006.

LYNCH, J.; BARBANO, D.; FLEMING, J. R. Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 763-774, 1998.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MACMILLAN, K. L.; DUIRS, G. F.; DUGANZICH, D. M. Association between dry cow therapy, clinical mastitis, and somatic cell count score with milk and fat production in ten New Zealand dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 2, p. 259-265, 1983.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.

MATOS, J. S.; WHITE, D. G.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1544-1549, 1991.

MATTHEWS, C. A.; SWETT, W. W.; GRAVES R. R. **Milk yields and milking rates of individual quarters of the dairy cow udder**. [Washington]: United States Department of Agriculture, 1941. 32 p. (Technical Bulletin, 827).

MAXWELL, M. L.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of mastitis pathogens directly from milk. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 47., 2008, New Orleans, Louisiana. **Anais...** Washington: National Mastitis Council, 2008. p. 212-213.

MCDUGALL, S.; AGNEW, K. E.; CURSONS, R.; HOU, X. X.; COMPTON, C. R. W. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 779-789, 2007.

MEIJERING, A.; JAARTSVELD, F. H. J.; VERSTEGEN, M. W. A.; TIELEN, M. J. M. The cell count of milk in relation to milk yield. **Journal of Dairy Research**, v. 45, n. 1, p. 5-14, 1978.

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

MIDDLETON, J.; FOX, L.; GAY, J.; TYLER, J.; BESSER, T. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 2, p. 387-395 2002.

- MILLER, R. H.; EMANUELSON, U.; BROLUND, L.; PERSSON, E.; FUNKE, H.; PHILIPSSON, J. Relationships of current bacteriological status of the mammary gland to daily milk yield and composition. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 34, n. 2, p. 133-144, 1984.
- MILTENBURG, J. D.; CRAUWELS, A. P. P.; BONGERS, J. H.; TIELEN, M. J. M.; SCHUKKEN, Y. H.; ELBERS, A. R. W. Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. **Veterinary Record**, v. 139, n. 3, p. 204–207, 1996.
- MYLLYS, V.; RAUTALA, H. Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 3, p. 538-545, 1995.
- NATZKE, R. P.; SCHULTZ, L. H.; BARR, G. R.; HOLTMANN, W. B. Variation in mastitis screening tests and milk composition of udder quarters under normal conditions and following omission of a milking. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 10, p. 1295-1299, 1965.
- NATZKE, R. P.; EVERETT, R. W.; GUTHRIE, R. S.; KEOWN, J. F.; MEEK, A. M.; MERRILL, W. G.; ROBERTS, S. J.; SCHMIDT, G. H. Mastitis Control Program: Effect on Milk Production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 9, p. 1256-1260, 1972.
- NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 361-366, 1994.
- NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R. L. Mastitis in Dairy Heifers: Initial Studies on Prevalence and Control. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 7, p. 1607-1618, 1995.
- NIELSEN, C. **Economic impact of mastitis in dairy cows**. 2009. 81 f. Thesis (Doctoral thesis) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, Uppsala, 2009.
- NOGVA, H. K.; DRØMTORP, S. M.; NISSEN, H.; RUDI, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 804–813, 2003.
- OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **The animal health and production compendium: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: Office International Des Épizooties. 2010. Disponível em: <<http://www.cabi.org/ahpc/default.aspx?site=160&page=3323>>. Acesso em: 4 jan. 2012.
- OLIVER, S. P.; GONZALEZ, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. N. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Verona, WI: National Mastitis Council, 2004.
- OLIVER, S. P.; MITCHELL, B. A. Prevalence of Mastitis Pathogens in Herds Participating in a Mastitis Control Program. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 10, p. 2436-2440, 1984.

OWENS, W., E.; OLIVER, S., P.; GILLESPIE, B., E.; RAY, C., H.; NICKERSON, S., C. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 9, p. 3, 1998.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A.; WILDMAN, E. E. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1550-1552, 1991.

PARADIS, M. -È.; BOUCHARD, É.; SCHOLL, D. T.; MIGLIOR, F.; ROY, J. -P. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2989-2997, 2010.

PEREIRA, J. C. R. **Bioestatística em outras palavras**. São Paulo: EDUSP, 2010. 424 p.

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

PIEPERS, S.; DE VliegHER, S.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 113-120, 2009.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYORÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.

PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p. 211-216, 2002.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; HARTIGAN, P.; FANNING, S.; FITZPATRICK, E. S. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. London: Wiley-Blackwell, 2011. 400 p.

RABELLO, R. F.; SOUZA, C. R. V. M.; DUARTE, R. S.; LOPES, R. M. M.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, A. C. D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3211-3219, 2005.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. London: W.B. Saunders, 2000. 1877 p.

RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. The central effectors of cell death in immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 781-828, 1999.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LAMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHOCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 314-322, 2008.

REKSEN, O.; SØLVERØD, L.; BRANSCUM, A. J.; ØSTERÅS, O. Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2928-2937, 2006.

RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P.; DROLET, M.; LAGACE, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2584-2589, 2001.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 11, p. 3354-3364, 1994.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 687-693, 1998.

ROGERS, S. A.; MITCHELL, G. E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. IV. Non-protein constituents. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 44, n. 2, p. 53-56. 1989.

RUSSELL, M. W.; BROOKER, B. E.; REITER, B. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, n. 1, p. 43-52, 1977.

SALMAN, S.; KHOL-PARISINI, S. H.; LARSEN-WIEDERHOLT, M. C.; HULAN, H. W.; DINSE, D.; ZENTEK, J. The role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 21-34, 2009.

SAMUELSON, D. A. **Textbook of veterinary histology**. St. Louis: Saunders-Elsevier, 2007. 546 p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314 p.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971.

SCHUKKEN, Y. S.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SCHULTZ, L. H. Somatic cells in milk: physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 125-131, 1977.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 93-108, 2003a.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 171-185, 2003b.

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

SEŠKĒNA, R.; JANKEVICA, L. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk samples. **Acta Universitatis Latviensis**, v. 723, Biology, p. 171–180, 2007.

SHKRETA, L.; TALBOT, B. G.; DIARRA, M. S.; LACASSE, P. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. **Vaccine**, v. 23, n. 1, p. 114-126, 2004.

SHOSHANI, E.; LEITNER, G.; HANOCHI, B.; SARAN, A.; SHPIGEL, N. Y.; BERMAN, A. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 2, p. 155-169, 2000.

SILBERNAGEL, K. M.; JECHOREK, R. P.; CARVER, C. N.; HORTER, B. L.; LINDBERG, K. G. 3M Petrifilm Staph Express Count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 5, p. 8, 2003.

SILVA, L. F. P.; ETCHEBARNE, B. E.; WEBER NIELSEN, M. S.; LIESMAN, J. S.; KIUPEL, M.; VANDEHAAR, M. J. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3034-3044, 2008.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Research**, v. 36, n. 4, p. 629-643, 2005.

SMITH, B. S.; HOGAN, J. S. The world of mastitis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY, 2., 2000, Vancouver, Canada. **Anais...** Washington: National Mastitis Council, 2000. 1-12 p.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.

STUDER, E.; SCHAEREN, W.; NASKOVA, J.; PFAEFFLI, H.; KAUFMANN, T.; KIRCHHOFER, M.; STEINER, A.; GRABER, H. U. A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1893-1902, 2008.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 79-89, 1994.

SWETT, W. W.; MATTHEWS, C. A.; MILLER, F. W.; GRAVES, R. R. Nature's compensation for the lost quarter of a cow's udder. **Journal of Dairy Science**, v. 21, n. 1, p. 7-11, 1938.

SWINKELS, J. M.; HOGEVEEN, H.; ZADOKS, R. N. A Partial Budget Model to Estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4273-4287, 2005.

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

TESFAYE, G.; REGASSA, F.; KELAY, B. Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 5, p. 925-931, 2010.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. Iowa: Willey-Blackwell, 2007. 612 p.

TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 49-56, 1997.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

WAAGE, S.; MØRK, T.; RØROS, A.; AASLAND, D.; HUNSHAMAR, A.; ØDEGAARD, S. A. Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

WALKER, J. B.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; DEGRAVES, F. J. Variation in daily shedding pattern of *Staphylococcus aureus* and somatic cell counts in naturally occurring intramammary infections. In: IDF MASTITIS CONFERENCE, 5., 2010, Christchurch, New Zealand. **Anais...** Brussels: International Dairy Federation, 2010. p. 408-412.

WARD, G. E.; SCHULTZ, L. H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 10, p. 1428-1431, 1972.

WELLENBERG, G. J.; SAMPIMON, O. C.; ROTHKAMP, A.; VAN HAERINGEN, W. A.; LAM, T. J. G. M. Detection of mastitis pathogens by real-time PCR in clinical and subclinical mastitis samples. In: IDF MASTITIS CONFERENCE, 5., 2010, Christchurch, New Zealand. **Anais...** Brussels: International Dairy Federation, 2010. p. 539-544.

WHEELOCK, J. V.; ROOK, J. A. F.; NEAVE, F. K.; DODD, F. H. The effect of bacterial infections of the udder on the yield and composition of cow's milk. **Journal of Dairy Research**, v. 33, n. 2, p. 199-215, 1966.

WHIST, A. C.; ØSTERÅS, O.; SØLVERØD, L. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 1, p. 24-35, 2009.

WILSON, C. D.; RICHARDS, M. S. A Survey of Mastitis in the British Dairy-Herd. **Veterinary Record**, v. 106, n. 21, p. 431-435, 1980.

WOOD, P. D. P.; BOOTH, J. M. Variation in milk cell counts during lactation of British Friesian cattle. **Animal Production**, v. 36, n. 3, p. 335-339, 1983.

YOUNIS, A.; KRIFUCKS, O.; HELLER, E. D.; SAMRA, Z.; GLICKMAN, A.; SARAN, A.; LEITNER, G. *Staphylococcus aureus* exosecretions and bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2003.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GRÖHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2649-2663, 2001.

ZADOKS, R. N.; FITZPATRICK, J. L. Changing trends in mastitis. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, p. 59-70, 2009. Supplement n. 1.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 229-261, 2006.

ZADOKS, R. N.; VAN LEEUWEN, W. B.; KREFT, D.; FOX, L. K.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3894-3902, 2002.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; CARVALHO, M. R. B.; LIMA, T. M. A. Influência da mastite subclínica bovina sobre as frações proteicas do leite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 135-140, 2008.

ZECCONI, A. Contagious mastitis control program: The *Staphylococcus aureus* case. **Cattle Practice**, v. 14, n. 2, p. 67-75, 2006.

ZECCONI, A.; BINDA, E.; BORROMEO, V.; PICCININI, R. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 203-208, 2005.

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E.; DAPRA, V.; PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, n. 4, p. 177-183, 2006.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 13, p. 57-65, 2008.