

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Contagem de Células Somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas
no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil**

CRISTIANE DA ROSA MORAES

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Contagem de Células Somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas
no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil**

Autora: Cristiane da Rosa Moraes*

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
Especialidade na área de
Bacteriologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Verônica
Schmidt

CRISTIANE DA ROSA MORAES

Porto Alegre, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

da Rosa Moraes, Cristiane
Contagem de Células Somáticas e isolamento
bacteriano em leite de ovelhas no Estado do Rio
Grande do Sul - Brasil / Cristiane da Rosa Moraes. -
- 2015.
73 f.

Orientadora: Verônica Schmidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. Contagem de Células Somáticas. 2. Isolamento
bacteriano. 3. Leite de ovelhas. 4. PCR RFLP. I.
Schmidt, Verônica, orient. II. Título.

Cristiane da Rosa Moraes

**Contagem de Células Somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas
no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil**

Aprovada em 26 de JUNHO de 2015

APROVADA POR:

Prof^ª. Dr^ª. Verônica Schmidt
Orientador e Presidente da Comissão

APROVADA POR:

Prof^ª. Dr^º. Marisa da Costa
Membro da Comissão

APROVADA POR:

Prof. Dr. João Luiz Zani
Membro da Comissão

APROVADA POR:

Prof^ª. Dr^ª. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

Dedico este trabalho ao meu marido,
Ricardo, que cuida de mim e da flor
mais bonita do meu jardim,
nossa filha, Giovana.
E a minha mãe, Eloá,
por todo cuidado e amor que
dedica a mim e a minha família.

*“Quem perde seus bens, perde muito;
Quem perde um amigo, perde mais;
mas quem perde a coragem perde tudo!
Miguel de Cervantes*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de aprender e por tudo que me foi proporcionado neste tempo dedicado à realização deste trabalho.

Agradeço **Profa. Dra. Verônica Schmidt** pela orientação, ensinamentos e tempo dedicado a mim.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Agradeço a colega **Karla Escopeli** pela amizade e por ter iniciado esta jornada comigo.

Agradeço aos colegas **Adriano Bruzza, Graciela Lopes, Juliana Velasco, Priscila Regina Guerra, Vanessa Laviniki e Verônica Machado** pela amizade e companheirismo.

Agradeço aos colegas de laboratório **Amanda Dias, Carolina Pissetti, Daniel Paim, Débora Pellegrini, Everton Juffo, Gabriela Orosco, Lisiane Moreira, Monica Maciel, Paola Roppa, Tatiana Vieira, Thais Campos e Vanessa Dias.**

Agradeço a **Dona Bernadete** por sempre ter me recebido com um grande sorriso e por manter tudo organizado.

A minha mãe, **Eloá Moraes**, por todo incentivo e carinho.

Ao meu marido, **Ricardo Ferrari**, por todo incentivo, carinho e por ter entendido todas as minhas ausências.

A minha filha, **Giovana Moraes Ferrari**, por ser a força que preciso para realizar as minhas tarefas.

Finalmente, para todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Contagem de Células Somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil

Autora: Cristiane da Rosa Moraes¹

Orientadora: Verônica Schmidt

RESUMO A mastite um dos grandes problemas relacionados com criação de ovinos de leite devido às perdas econômicas decorrentes da redução na produção, gastos com medicamento e perdas de animais. A Contagem de Células Somáticas (CCS) e o isolamento bacteriano são ferramentas diagnósticas indicativas da saúde da glândula mamária que pode ser determinada através de método automatizado e por método manual, através de contagem celular em microscópio, sobre o qual existem discussões quanto à coloração adequada ao leite de ovelhas devido a celularidade diferenciada nesta espécie. Esta tese compreende três estudos que visam realizar o diagnóstico de mastite subclínica em ovelhas leiteiras do Estado Rio Grande do Sul – Brasil em um total de 315 amostras de leite oriundas de casos desta enfermidade em ovelhas de leite. **[Capítulo 2]** Foram utilizadas 116 amostras com o objetivo de identificar e validar uma metodologia de CCS microscópica adequada à espécie ovina. Assim foram confeccionadas lâminas de esfregaços de 10 µL de leite em 1 cm², onde foram testados os fixadores de xilol e solução de Carnoy e as colorações de May-Grünwald (MG), Broadhurst- Paley (BP), Wrigth (W) e Panótico (P). Elegeu-se a solução de Carnoy, pois esta permitiu uma melhor fixação do filme lácteo às lâminas de microscopia, e o corante BP, pois permitiu uma boa coloração e visualização das células, bem como a diferenciação dos corpúsculos citoplasmáticos. Os valores de CCS variaram de 2,6x10⁴ a 4,4x10⁶ células.mL⁻¹ e de 1,9x10⁴ a 8,1x10⁶ células.mL⁻¹, respectivamente, pelos métodos automático e microscópico. **[Capítulo 3]** O objetivo do presente capítulo foi determinar a ocorrência de mastite subclínica em rebanho ovino leiteiro, através do isolamento bacteriano e da CCS. Determinou-se, ainda, a composição (gordura, lactose, proteína e sólidos totais) do leite e a relação entre estes parâmetros e a presença de mastite. Para tanto, coletaram-se 315 amostras de leite, individualizadas por teto, das quais 85 (27%) foram identificadas como mastite subclínica, sendo *Staphylococcus* coagulase negativos o agente prevalente (64,7%), seguido por *Staphylococcus* coagulase positivas (19,1%). A CCS variou de 2,5x10³ a 9,3x10⁶. Verificou-se CCS significativamente maior (p<0,0001) nas amostras com isolamento bacteriano. Entretanto, o mesmo não foi observado entre os parâmetros de composição. Não foi determinada correlação entre os parâmetros de composição e a CCS. **[Capítulo 4]** Este capítulo teve como objetivos identificar as espécies de SCN em 32 isolados de casos de mastite subclínica em ovinos, através da técnica de PCR-RFLP e sequenciamento do gene *gap*, e determinar a suscetibilidade dos isolados frente a nove agentes antimicrobianos, pela técnica de disco difusão em ágar. Foram obtidos quatro perfis no sequenciamento, sendo observada a presença de três espécies de SCN: *Staphylococcus epidermidis* (59,4%), *Staphylococcus chromogenes* (34,4%) e *Staphylococcus devriesei* (6,2%), pela primeira vez descrita na região Sul do país em casos de mastite ovina. Todos os isolados foram suscetíveis a cefalotina, ceftiofur e penicilina+novobiocina. Vinte e um isolados (65,6%) apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano e onze isolados (34,4%) mostraram-se suscetíveis a todos os agentes testados. Quatro isolados (12,5%) apresentaram multirresistência e, entre estes, um isolado da espécie *S. epidermidis* apresentou resistência à oxacilina, confirmada através da amplificação do gene *mecA* por PCR. Os estudos permitem concluir que os

SCN são os agentes etiológicos mais prevalentes relacionados com mastite subclínica em ovelhas leiteiras e sua presença tem correlação com CCS elevada. A determinação da CCS através de método manual demonstra que esta é uma ferramenta aplicável à espécie ovina. Além de se constituir em problema de sanidade animal, a mastite ovina, tem como consequência perdas econômicas ao produtor, SCN possuem potencial zoonótico, destacando a importância destes micro-organismos na saúde pública, tornando primordial a identificação destes agentes, através de ferramentas genotípicas seguras e confiáveis.

¹Tese de Doutorado, Doutorado em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Preventiva, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (74p.), Junho, 2015.

Somatic Cell Count and bacterial isolation in dairy sheep in the state of Rio Grande do Sul - Brazil

Author: Cristiane da Rosa Moraes¹

Supervisor: Verônica Schmidt

ABSTRACT

The mastitis is one of the major problems related to breeding of milk sheep due to the economic losses arising from the reduction in production, expenditure on medication and loss of animals. The Somatic Cell Count (SCC) and bacterial isolation are diagnostic tools indicative of mammary gland's health that can be determined by automated method and manual method, through the counting of cell under a microscope, whereupon there are discussions concerning the appropriated staining to the ewe's milk due to different cellularity in this species. This thesis comprises three studies that aim to make the diagnosis of subclinical mastitis in dairy sheep in Rio Grande do Sul - Brazil in a total of 315 milk samples originated from cases of this disease in dairy sheep. **[Chapter 2]** It were used 116 samples to identify and validate a method for microscopic SCC suitable for ovine specie. Therefore, were made glass slides for smear of 10 μ L of milk in 1 cm², where were tested xylol fixers and Carnoy solution and May-Grünwald (MG), Broadhurst- Paley (BP), Wright (W) and Panotic (P) dyes. Carnoy solution was elected, because this one allowed a better fixation of the milk film to the microscope slides, and BP staining as it allowed a good staining and visualization of cells and the differentiation of cytoplasmic corpuscles. The SCC values ranged from 2,6x10⁴ to 4,4x10⁶ cells.mL⁻¹ and 1,9x10⁴ to 8,1x10⁶ cells.mL⁻¹, respectively by automatic and microscopic methods. **[Chapter 3]** The purpose of this chapter was to determine the occurrence of subclinical mastitis in dairy sheep flock, by bacterial isolation and SCC. It was determined also the composition (fat, lactose, protein and total solids) of milk and the relationship between these parameters and the presence of mastitis. In order to do that, were collected 315 milk samples, individualized by teat, of which 85 (27%) were identified as subclinical mastitis and *Staphylococcus* coagulase negative (SCN) was the prevalent agent (64.7%), followed by *Staphylococcus* coagulase positive (SCP) (19.1%). The SCC ranged from 2,5x10³ to 9,3x10⁶. There was significant higher SCC ($p < 0.0001$) in samples with bacterial isolation. However, the same was not observed between the composition parameters. There was no correlation between the composition parameters and SCC. **[Chapter 4]** This chapter aims to identify the species of CNS in 32 isolated from cases of subclinical mastitis in sheep by PCR-RFLP and sequencing of the gap gene and determine the susceptibility of isolates face to nine antimicrobials, by disk agar diffusion technique. Four profiles were obtained in sequencing, revealing the presence of three species of SCN: *Staphylococcus epidermidis* (59.4%), *Staphylococcus chromogenes* (34.4%) and *Staphylococcus devriesei* (6.2%), first described in the south region of the country in cases of sheep mastitis. All isolates were susceptible to cephalothin, ceftiofur and penicillin + novobiocin. Twenty-one isolates (65.6%) showed resistance to at least one antimicrobial agent and eleven isolates (34.4%) were susceptible to all tested agents. Four isolates (12.5%) had multidrug resistance and, among these, an isolated of *S. epidermidis* was resistant to oxacillin, confirmed by amplifying the *mecA* gene by PCR. The studies support the conclusion that the SCN are the most prevalent etiologic agents related to subclinical mastitis in dairy sheep and their presence correlates with high SCC. The determination of SCC through manual method demonstrates that this tool is applicable to the ovine species. Besides being an animal health problem, the sheep mastitis results in

economic losses to producers, SCN have zoonotic potential, highlighting the importance of these microorganisms in public health, making it crucial to identify these agents through secure and reliable genotypic tools.

¹Doctoral Thesis, Doctor of Veterinary Science, Department of Preventive Medicine, Graduate Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (74p.) June, 2015.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Mastite	15
3.2 Principais agentes etiológicos relacionados à mastite	16
3.2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	18
3.3 Fatores predisponentes para a ocorrência de mastite	19
3.4 Diagnóstico de mastite	20
3.4.1 Contagem de células somáticas (CCS) em leite de ovelha.....	21
3.4.2 Detecção de mastite na espécie ovina utilizando CCS.....	22
3.4.3 Influência das células somáticas na qualidade do leite e seus derivados.....	24
3.5 Terapia antimicrobiana e perfil de suscetibilidade	25
3.6 Composição do leite de ovelha	27
CAPÍTULO 2 - Avaliação e validação de método microscópico para contagem de células somática no leite de ovelhas leiteiras	28
CAPÍTULO 3 - Caracterização da mastite subclínica em ovelhas leiteiras	39
CAPÍTULO 4 - Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN) isolados de leite ovino e perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos	49
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves à criação de ovinos leiteiros é a sanidade da glândula mamária, sendo a mastite um dos grandes problemas relacionados com esta atividade. Esta enfermidade é responsável por perdas importantes no volume e na qualidade do leite produzido o que reflete, diretamente, em perdas econômicas. Existe escassez de estudos acerca desta doença na espécie ovina, apesar de ser bastante estudada na espécie bovina (BAGLITZ *et al.*, 2008). A presença de micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus* sp. e, entre estes, os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), têm se mostrado como potenciais patógenos responsáveis por casos de mastite em pequenos ruminantes (COUTINHO; COSTA, 2006; FTHENAKIS, G C; JONES, 1990; TEJADA *et al.*, 2012).

Para realizar o diagnóstico de mastite podem ser utilizados diferentes métodos como: microbiologia clássica, através do isolamento do agente etiológico (BARBOSA *et al.*, 2012); exames indiretos, como contagem de células somáticas (CCS)(BERGONIER; BERTHELOT, 2003; SCHALM; CARROL; JAIN, 1971), de forma automatizada ou por microscopia direta (GOMES *et al.*, 2008) e através da identificação molecular dos agentes responsáveis pela mastite, baseados na sequência de DNA (HOSSEINZADEH; DASTMALCHI SAEI, 2014; ONNI *et al.*, 2010)

A CCS é uma ferramenta importante utilizada como indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, sendo bastante estudada na espécie bovina (VIANA *et al.*, 2010). O leite de ovelha é uma secreção apócrina e apresenta celularidade diferenciada do leite de vaca (MADUREIRA *et al.*, 2010). Para CCS em ovelhas, existe a possibilidade de utilização de diferentes protocolos de coloração específica para o DNA, os quais, de acordo com a literatura, são mais adequados para pequenos ruminantes. Porém, a CCS realizada com colorações não específicas para DNA em ovinos pode ser uma ferramenta aplicável (BAGLITZ *et al.*, 2013). Atualmente, é aceito a utilização de outras colorações como May-Grünwald, Broadhurst-Paley, Panótico, entre outras (VIANA *et al.* 2010). Entretanto, ainda existe muita discussão em relação à coloração mais adequada para o leite dos pequenos ruminantes (GOMES *et al.*, 2008).

O presente estudo tem como objetivo avaliar os métodos de diagnóstico de mastite em ovelhas, isolar e identificar os principais agentes envolvidos, avaliar os métodos de

contagem de células somáticas (CCS) para esta espécie, bem como analisar o perfil microbiológico e molecular das cepas de isoladas nos casos de mastite.

Esta tese está dividida em 4 capítulos. O **capítulo 1** corresponde à introdução, objetivos e revisão bibliográfica sobre mastite na espécie ovina. Nos demais capítulos, redigidos na forma de artigos científicos, são apresentados os resultados do estudo. O **capítulo 2** descreve a metodologia padronizada para determinação da CCS através de método direto; o **capítulo 3** trata do isolamento e identificação dos agentes microbianos por microbiologia clássica e CCS realizada nas amostras e, por fim, no **capítulo 4**, é abordado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a identificação molecular dos micro-organismos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) pelo método de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polimorphysm* - RFLP) e posterior confirmação da identificação baseada na sequência de DNA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi realizar o diagnóstico de mastite subclínica em ovelhas leiteiras do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar e validar uma metodologia de contagem microscópica adequada à espécie ovina.
- b) Determinar a ocorrência de mastite subclínica em rebanho ovino leiteiro, através do isolamento bacteriano e da Contagem de Células Somáticas (CCS).
- c) Determinar a composição média do leite ovino e a relação entre estes parâmetros e a presença de mastite.
- d) Identificar as espécies de SCN em isolados de casos de mastite subclínica em ovinos, através da técnica de PCR-RFLP e sequenciamento do gene *gap*
- e) Determinar a suscetibilidade dos SCN isolados frente a nove agentes antimicrobianos, pela técnica de disco difusão em ágar.
- f) Confirmar a presença do gene *mecA* de resistência à oxacilina através da amplificação por PCR

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mastite

Um dos principais problemas de sanidade enfrentados pelos produtores de ovino leiteiros é a mastite. Esta enfermidade é definida como alteração físico-química e/ou microbiológica da glândula mamária, podendo acarretar a diminuição ou queda na produção leiteira, bem como, afetar a qualidade do leite e de seus derivados (BAGLITZ *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2012; COUTINHO; COSTA, 2006). A enfermidade da glândula mamária pode ter diversas etiologias, tais como: tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Entretanto, as causas infecciosas são as mais comuns, sendo as bacterianas as que mais ocorrem. Outros agentes etiológicos também estão implicados nesta enfermidade como fungos, algas, vírus (FONSECA; SANTOS, 2000).

A enfermidade permite que seja dividida, basicamente, em forma clínica ou subclínica, de acordo com a sua manifestação. Na forma clínica, o diagnóstico é realizado de forma mais simples, pois baseia-se na visualização de alterações no úbere e no leite, apresentando incidência inferior a 5%. Por sua vez, a forma subclínica necessita de ferramentas para detecção de células somáticas e cultivo microbiológico, podendo apresentar incidência entre cinco a 30% (CONTRERAS *et al.*, 1995; PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2010).

A doença da glândula mamária na forma aguda é, normalmente, unilateral, com aumento de volume e sensibilidade do úbere. A mastite gangrenosa, em ovelhas, pode ocorrer no período entre duas a três semanas pós-parto, a glândula pode aumentar de tamanho consideravelmente, ficando entre quatro a cinco vezes maior quando comparada a glândula hígida. O acometimento, normalmente, é unilateral, com sinais de processo inflamatório, dolorida, quente e de coloração avermelhada que pode logo torna-se preto-azulada devido à necrose. Edema pode estar presente, estendendo-se da região umbilical até a vulva. Sinais inespecíficos também podem ser comuns, como hipertermia (entre 40 e 42°C), anorexia, apatia, problemas respiratórios e de locomoção (RIET-CORREA *et al.*, 2007).

Os agentes etiológicos da mastite podem ser classificados em contagiosos e ambientais. A mastite contagiosa caracteriza-se por baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos. A transmissão dos agentes etiológicos contagiosos ocorre, principalmente, na ordenha ou

no ato de mamar dos cordeiros, cujo habitat natural é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos (LANGONI; DOMINGUES; BALDINI, 2006).

A mastite ambiental é causada por micro-organismos oportunistas que podem viver no ambiente por longos períodos. Normalmente, são microrganismos de origem fecal como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. entre outros. Além da etiologia bacteriana, microalgas, como *Prototheca zopfii*, podem estar implicadas. Mastites micóticas também podem estar relacionadas com patógenos ambientais (SPANAMBERG *et al.*, 2009). A transmissão dos agentes etiológicos pode ocorrer no período entre as ordenhas, principalmente, quando os animais se deitam em ambientes contaminados. Pode ocorrer também durante a ordenha, pelas mãos do ordenhador ou pelos equipamentos utilizados na ordenha mecânica, como teteiras (CASSOL *et al.*, 2010).

3.2 Principais agentes etiológicos relacionados à mastite

Na atualidade, mais de 50 espécies e subespécies de bactérias do gênero *Staphylococcus* são implicadas em casos de mastite, sendo que este gênero está dividido em *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) de acordo com a capacidade de coagular o plasma sanguíneo de coelho (PODKOWIK *et al.*, 2013; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

Um dos agentes etiológicos mais prevalentes em casos de mastite bovina, pertence ao gênero *Staphylococcus*. Dentro este gênero, destaca-se o *S. aureus*, um SCP, como o principal agente isolado em casos de infecção da glândula mamária nesta espécie (LANGE *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2012; ROYSTER; WAGNER, 2015). Anteriormente, os SCN não eram relacionados como patógenos de relevância em casos de mastite bovinos, principalmente quando comparados com patógenos mais importantes como o *S. aureus*, e eram classificados como patógenos de menor relevância dentro das possíveis etiologias da glândula mamárias em grandes ruminantes. Contudo, os SCN começaram a ser isolados com maior frequência em casos de mastite na espécie bovina e são considerados patógenos emergentes (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; SAMPIMON *et al.*, 2011).

Atualmente, mais de 15 espécies de SCN já foram relacionadas com mastite bovina, sendo *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. haemolyticus* os mais comumente identificados. A importância clínica dos SCN ainda é bastante discutida em bovinos. Alguns pesquisadores os consideram um importante agente causador de mastite devido aos seus fatores de virulência, alto nível de resistência aos antimicrobianos e de sua habilidade em causar infecções crônicas. Por outro lado, outros os consideram patógenos de menor relevância relacionados a esta enfermidade. (HOSSEINZADEH; DASTMALCHI SAEI, 2014).

Os SCN fazem parte da microbiota normal da pele e de forma oportunista, podendo causar a infecção na glândula mamária. Apresentam habilidade em formar biofilmes tornando-se capazes de se manterem em equipamentos utilizados na ordenha e nas mãos dos ordenadores, característica que facilita sua disseminação (EL-JAKEE *et al.*, 2013).

Em ovinos, existem dois principais agentes causadores de mastite clínica, *S. aureus* e *Mannheimia* sp. Aproximadamente, 40% dos casos de mastite clínica em ovelhas com cria ao pé e 80% dos casos em ovelhas leiteiras devem-se à *S. aureus*. *Mannheimia* sp. é responsável por 40% dos casos de mastite clínica em ovelhas lactentes. Outros agentes são responsáveis pela enfermidade da glândula mamária em ovelhas que estão amamentando, como *Escherichia coli* e *Streptococcus* sp. (MAVROGIANNI *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que a causa mais comum de mastite em ovelhas está relacionada aos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) (BARILLET *et al.*, 2001; BERGONIER; BERTHELOT, 2003; DALL AGNOL *et al.*, 2013; OLIVES *et al.*, 2013; TEJADA *et al.*, 2012). Entre os SCN, *S. epidermidis* e *S. chromogenes* são os mais prevalentes e estão, frequentemente, associados a mastites subclínicas em ovinos (FTHENAKIS, G.C., 1994; LEITNER *et al.*, 2003, 2004). Segundo MARKEY *et al.* (2013), *S. chromogenes* e *S. hyicus*, ambos SCN, são causas de mastite subclínica em caprinos e ovinos. Os mecanismos de patogenicidade nos quadros subclínicos da enfermidade da glândula mamária ainda não foram bem determinados, embora os SCN sejam considerados os principais causadores da doença em pequenos ruminantes (CONTRERAS *et al.*, 2007).

Outros SCN têm sido implicados em casos de mastite e, devido ao aumento significativo de casos envolvendo este grupo de micro-organismo, sua identificação em nível de espécie torna-se imprescindível, bem como analisar a epidemiologia destas

espécies. A identificação molecular dos SCN, baseados na sequência de DNA, tem apresentado maior acurácia quando comparada aos métodos de identificação fenotípicos, sendo considerado o método padrão-ouro para identificação destes agentes. (HOSSEINZADEH; DASTMALCHI SAEI, 2014; ONNI *et al.*, 2010; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

Na forma subclínica, além dos SCN, relatam-se *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. e enterobactérias como agentes de mastite (COUTINHO; COSTA, 2006; GUARANÁ *et al.*, 2011; MCDUGALL *et al.*, 2001; MENDONÇA *et al.*, , 2012) No Brasil, dados de ocorrência de inflamação da glândula mamária em pequenos ruminantes ainda são escassos e existem as variações dos dados acerca da taxa de prevalência da mastite em caprinos e ovinos (PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010).

3.2.1 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Microcococcaceae*, são bactérias Gram-positivas, formato esférico, apresentando em torno de 1µm de diâmetro, frequentemente agrupadas em cachos de uva e as colônias apresentam-se, usualmente, com coloração branca. Não formam esporos, são imóveis e a maioria são anaeróbicas facultativas e com metabolismo fermentativo. São descritas em torno de 30 espécies dentro deste gênero e grande parte é patogênica. São consideradas patógenos oportunistas e as infecções, normalmente, são agudas e piogênicas. Dentro deste gênero existem duas espécies que são consideradas patógenos importantes, *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, ambas *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP). O teste da coagulase, usualmente, está relacionado com espécies patogênicas. *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), são comensais e ambientais. Os SCN são considerados integrantes da flora normal de humanos e animais e, ocasionalmente, podem causar infecções oportunistas (MARKEY *et al.*, 2013).

É importante salientar o aspecto de saúde pública para cepas produtoras de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico. A enterotoxina A, relacionada com maior ênfase nos casos de intoxicações alimentares, pode ser veiculada pelo leite cru, pasteurizado e derivados lácteos. A síndrome do choque tóxico é determinada mais comumente pela toxina do choque tóxico, no entanto as enterotoxinas do tipo B e C

também podem ser relacionadas (SÁ *et al.*, 2014). As toxinas estafilocócicas podem estar presentes em alimentos contaminados, uma vez que, não existe comprovação de inativação das mesmas nos processos de tratamento térmico, como pasteurização e esterilização, sendo assim, a presença de bactérias produtoras de enterotoxinas são um risco à saúde pública (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Uma vez ingeridas, estas toxinas podem desencadear sinais clínicos de gastroenterites agudas (VALLE *et al.*, 1990). Segundo PELISSER *et al.* (2009) níveis baixos (entre 20ng e 1µg) de toxinas já são capazes de causar toxinfecção alimentar, o que equivale, aproximadamente, a 10⁵ UFC por grama ou mililitro de alimento.

As enterotoxinas produzidas pelos estafilococos são capazes de causar intoxicações alimentares, sendo a toxina do *S. aureus* a mais implicada nestes casos (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; PELISSER *et al.*, 2009). Na atualidade foram identificadas 23 enterotoxinas diferentes produzidas pelo *S. aureus* (PODKOWIK *et al.*, 2013). Outros *Staphylococcus* sp. podem produzir enterotoxinas, além do *S. aureus*. Alguns SCN têm demonstrado potencial para produção de toxinas, tais como *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus* (PEREIRA; CARMO; PEREIRA, 2001), contudo, sabe-se pouco sobre o potencial enterotoxigênico dos SCN (PODKOWIK *et al.*, 2013).

3.3 Fatores predisponentes para ocorrência de mastite

Segundo PRESTES; FILAPPI; CECIM (2002) apresentação da mastite obedece a tríade epidemiológica, onde existem fatores ligados ao hospedeiro como a resistência natural, estágio da lactação, hereditariedade e idade; fatores ligados ao agente etiológico, como espécie, patogenicidade e infectividade; e o ambiente, o qual também possui relevante influência na mastite. A ordenha, por si só, já constitui um fator importante na determinação da enfermidade, pois influencia direta ou indiretamente na saúde da glândula mamária. Como aspectos negativos envolvidos na mastite em relação à ordenha são citados: 1) facilidade de transmissão de agentes etiológicos entre animais, flutuações no sistema a vácuo (movimento reverso do leite), exposição do canal do teto aos microorganismos (microlesões), modificação do ambiente intramamário. Ainda entre os fatores ambientais são implicados o clima (mudança de temperatura e umidade) e o manejo dos animais. A nutrição dos animais também assume papel importante, pois o desequilíbrio

de certos nutrientes pode afetar os mecanismos de defesa, entre eles vitamina E e selênio, que exercem influência na função das células fagocitárias que combatem os micro-organismos patogênicos.

Na epidemiologia da mastite em ovinos devem ser considerados dois fatores: fêmea com cria ao pé e ordenha sem presença do cordeiro (VAZ, 1996). O cordeiro apresenta *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* na cavidade oral e faringe e a transmite à mãe no ato de mamar (RADOSTIS; GAY; BLOOD, 2002). Por outro lado, *S. aureus* assume papel determinante na ordenha sem cordeiro, pois é considerada a bactéria isolada com maior frequência nesta enfermidade (MOTA, 2008)(MOTA, 2008). A inflamação/infecção do tecido glandular mamário ocorre, com maior frequência, em torno da terceira e quarta semanas pós-parto, sendo que este período de apresentação tem relação com o pico de produção de leite. A apresentação da doença após o desmame pode ser reflexo de caso não detectado no período da lactação (VAZ, 1996).

3.4 Diagnóstico de mastite

Diferentes métodos de diagnóstico podem ser empregados para detecção da mastite. Existem métodos, como o exame direto que, através do isolamento e identificação do agente etiológico, confirma a presença/ausência do micro-organismo responsável pelo processo de infecção de glândula mamária, devendo sempre ser acompanhados de provas de suscetibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) para estabelecimento de terapia antimicrobiana adequada (BARBOSA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2010).

A taxa de incidência em mastite subclínica em pequenos ruminantes está entre cinco e 30%. Na forma clínica da doença este número não ultrapassa 5% dos casos anuais em caprinos e ovinos (CONTRERAS *et al.*, 2007).

O diagnóstico correto de mastite deve ser realizado o mais rápido possível, e deve ser baseado nos achados clínicos para mastite clínica e, no caso da forma subclínica, através da redução do volume de leite produzido. Para sua realização, o diagnóstico deve estar apoiado nos seguintes pontos: (i) mastite bacteriana, normalmente de aparecimento esporádico e comprometimento unilateral da glândula e tentativa de isolamento o agente etiológico; (ii) mastite por *Mycoplasma* sp. (RIET-CORREA *et al.*, 2007),

comprometimento bilateral e isolamento do agente e (iii) lentiviruses, como Maedi-Visna em ovinos (PAAPE *et al.*, 2007), geralmente bilateral e com presença de sinais respiratórios e neurológicos. Algumas vezes existe a necessidade de levar em consideração a ocorrência de outros problemas que podem afetar a glândula mamária como hematomas, cistos, neoplasias, edemas ou ruptura do ligamento suspensor do úbere (FRAGKOU; BOSCOS; FTHENAKIS, 2014).

Existe, também, o exame indireto o qual se baseia na intensidade de evolução da doença. Neste caso, pode ser citada a contagem de células somáticas (CCS) (SCHALM; CARROL; JAIN, 1971), através da pesquisa de polimorfonucleares por equipamentos eletrônicos, os quais realizam contagem automatizada das células, ou de forma manual (observação microscópica), através de coloração dos núcleos das células específicas ao processo inflamatório. Contudo, existe escassez de literatura sobre a CCS em ovelhas e os resultados para interpretação são obtidos na espécie bovina (BARBOSA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2010).

A glândula mamária de ovinos e caprinos é formada por ácinos constituídos de células epiteliais. A secreção láctea destas espécies é do tipo apócrina, diferenciando-se da secreção dos bovinos que é merócrina (BARBOSA *et al.*, 2012; TEJADA *et al.*, 2012). A secreção apócrina caracteriza-se pela separação da porção distal das células epiteliais de sua base, sendo eliminadas no lúmen dos ácinos na forma de corpúsculos citoplasmáticos com tamanhos diferenciados, com dimensões entre cinco a 30 milímetros, os quais possuem morfologia e dimensões semelhantes aos leucócitos (CONTRERAS *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2010; MADUREIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012).

3.4.1 Contagem de células somáticas (CCS) em leite de ovelha

Células somáticas são estruturas de defesa do organismo frente à inflamação ou infecção, sendo compostas por células do sistema imune (polimorfonucleares) e células epiteliais. A CCS é uma ferramenta importante utilizada como indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, sendo bastante estudada na espécie bovina (VIANA *et al.*, 2010). Porém, a utilização desta técnica de contagem celular é pouco conhecida na espécie ovina com aptidão leiteira, principalmente na raça Lacaune (GOMES *et al.*, 2008).

Através da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram estabelecidos os parâmetros mínimos de qualidade para o leite bovino cru nas propriedades rurais, incluindo limites máximos para CCS. No entanto, a legislação brasileira não contempla valores de CCS para o leite produzido especificamente por ovelhas, sendo que nesta espécie são utilizados valores descritos para bovinos (BRASIL, 2002).

Já está bem definido na literatura que a ocorrência de mastite é o fator que mais interfere na produção e qualidade do leite, embora fatores ambientais e fisiológicos também devam ser considerados (ANDRADE; HARTMANN; MASSON, 2009; WELLNITZ *et al.*, 2009). O aumento do interesse na realização de mais estudos que avaliem a influência da CCS sobre a qualidade do leite e derivados é explicado pela relação direta entre o comprometimento da glândula mamária pela mastite e a alteração das características do leite, conseqüentemente influenciando a qualidade e rendimento de queijos e outros derivados (SUMMER *et al.*, 2012).

3.4.2 Detecção de mastite na espécie ovina utilizando CCS

A composição média de células somáticas em leite oriundo de ovelhas sadias possui entre 50 a 70% de macrófagos, 15 a 40% de polimorfonucleares, 6 a 14% de linfócitos e menos de 5% de células de origem epitelial (MENZIES; RAMANOON, 2001).

Existem diferentes métodos para diagnosticar mastite nos rebanhos leiteiros como o *California Mastitis Test* (CMT), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) e CCS automatizada ou por microscopia (GOMES *et al.*, 2008). O CMT mensura, de forma indireta, a concentração de leucócitos no leite, sendo bastante utilizado e vantajoso devido à praticidade de ser realizado no momento da ordenha, baixo custo, leitura e interpretação imediata do resultado. Este teste tem como objetivo a determinação da quantidade de células somáticas encontradas no leite, refletindo a qualidade e a sanidade da glândula mamária. Estudos mostram correlação entre o CMT e CCS para a espécie bovina (JORGE *et al.*, 2005). No entanto, para ovinos, o uso do CMT apresenta limitações, pois não foi desenvolvido para esta espécie (NUNES *et al.*, 2008), sendo considerado, portanto, um teste subjetivo e inseguro (DOMINGUES *et al.*, 2006). A utilização de CMT para ovinos

ainda permanece controversa, pois existe a possibilidade de resultados falso-positivos devido à elevada CCS fisiológica nesta espécie (PRADIEÉ *et al.*, 2012).

A contagem automatizada das células somáticas pode ser realizada através de contadores de partículas ou por citometria de fluxo. A contagem de partículas, baseada na leitura de impulsos elétricos, resulta no dobro do número de células quando comparada ao método de citometria, pois podem influenciar na contagem a concentração de lipídeos e de corpúsculos citoplasmáticos. Em pequenos ruminantes, a contagem microscópica direta é considerada um dos métodos com resultados mais confiáveis, principalmente, se forem empregados colorações específicas para o DNA como a coloração de May Grünwald-Giemsa, verde de metila e pironina-Y (MADUREIRA *et al.*, 2010).

Para CCS em ovelhas, existe a possibilidade de utilização de diferentes protocolos de coloração específica para o DNA, os quais são mais adequados para pequenos ruminantes. A CCS realizada com colorações não específicas para DNA em ovinos pode ser uma ferramenta aplicável, porém devem utilizar equações para estimar a celularidade presente nas amostras (BAGLITZ *et al.*, 2013). O método clássico, sugerido por PRESCOTT; BREED (1910), continua sendo empregado, mas sofreu modificações, pois pode ser bastante laborioso. Atualmente, é aceita a utilização de outras colorações como May-Grünwald, Broadhurst-Paley, Panótico, entre outras (VIANA *et al.*, 2010). Durante a ocorrência da enfermidade no úbere, o sistema imune torna-se ativo e um grande número de leucócitos encaminha-se para a glândula mamária e, em decorrência deste trânsito celular, a contagem de células somáticas se eleva (SUMMER *et al.*, 2012; WICKSTRÖM *et al.*, 2009)

Em meados da década de 1980, havia uma controvérsia entre os valores de CCS em ovelhas, pois alguns autores consideravam normais valores iguais a 2 milhões de células.mL⁻¹, já outros, admitiam que o valor normal era de 500 mil células.mL⁻¹ (HARTMAN; BOLSANELLO; DOMINGUES, 2009).

Na espécie ovina, são considerados fisiológicos para glândula mamária sadia valores de CCS abaixo de $0,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (BAGLITZ, M. G. *et al.*, 2008; BERGONIER; BERTHELOT, 2003; GONZALO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012). Os valores entre $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ são sugestivos de mastite e para estes existe a necessidade de realização de diagnóstico bacteriológico. Para valores de CCS individual superiores a $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹, não existe a obrigatoriedade de realização de exame bacteriológico, pois está confirmado que glândula

mamária apresenta-se com mastite nas formas subclínica ou clínica (FRAGKOU; BOSCO; FTHENAKIS, 2014).

Outros autores sugerem que mesmo valores baixos, como $0,25 \times 10^6$ células.mL⁻¹, já podem ser interpretados como mastite subclínica (ARIZNABARRETA; GONZALO; PRIMITIVO, 2002). É sugerido que ovelhas que apresentem, em três coletas consecutivas, valores de CCS iguais ou superiores 400×10^3 células.mL⁻¹, possuem uma maior predisposição (5,6 a 7,5 vezes maior) a apresentarem isolamento positivo para agentes etiológicos de mastite do que aquelas com valores mais baixos do que este limite (SPANU *et al.*, 2011).

3.4.3 Influência das células somáticas na qualidade do leite e seus derivados

O principal efeito da infecção da glândula mamária em ovinos é a queda da produção e da qualidade do leite, que acarreta perdas econômicas maiores do que aquelas relativas à espécie bovina (LEITNER *et al.*, 2003, 2004). A qualidade da matéria-prima, devido a fatores como manejo, nutrição e genética, tem sido listada como entrave ao desenvolvimento da indústria de leite e derivados de origem ovina, pois influencia diretamente a qualidade do produto final (BAGLITZ *et al.*, 2013).

É importante salientar que, além da queda na produção leiteira, ocorrem alterações na composição do leite. Os teores de proteína, lactose e gordura podem ser significativamente afetados, levando a mudanças nas características tecnológicas como rendimento de queijos, entre outros (PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010).

Os efeitos indesejáveis no leite e derivados são causados, principalmente, pela proteólise e lipólise de origem enzimática, as quais podem conferir alterações organolépticas nos produtos. A ação de proteases reduz significativamente a caseína e os íons de cálcio em leites com alta CCS. Esta alteração na composição é indesejável na produção de queijos, pois há diminuição do rendimento, aumento de perda das proteínas do soro, maior degradação proteica, diminuição na vida de prateleira, favorecendo alterações no perfil e teor das aminas biogênicas, como histamina e tiramina, que são substâncias que podem colocar em risco a saúde do consumidor (BUENO *et al.*, 2005).

Em estudo sobre infecções da glândula mamária de ovelhas, foi demonstrado que o percentual de gordura era mais alto em úberes infectados em comparação aos não

acometidos por infecção, atribuindo este fato a redução de produção de leite oriundos de animais com mastite subclínica (LEITNER *et al.*, 2003). Segundo SCHALM; CARROL; JAIN (1971) a diminuição no teor de gordura no leite pode ser explicada pela redução da síntese deste componente devido à injúria nas células secretoras. Quando a CCS em ovinos esteve em níveis superiores a 250×10^3 células.mL⁻¹ houve aumento significativo nos teores de proteína e gordura e uma diminuição no teor de lactose (OLECHNOWICZ *et al.*, 2010).

A CCS expressa de forma direta à mastite, sendo indicada como parâmetro utilizado para avaliar a sanidade da glândula mamária e estabelecer uma relação com a qualidade higiênico-sanitária do leite e deve ser empregada como ferramenta no controle da mastite. Como fator isolado a CCS não influencia na saúde humana, entretanto, a detecção de altas contagens de células somáticas pode pressupor risco de contaminação do leite por micro-organismos patogênicos e outras substâncias o que coloca em risco à saúde do consumidor (AMARAL, F. R., CARVALHO, L. B., BRITO, J. R. F., SILVA, 2005).

3.5 Terapia antimicrobiana e perfil de suscetibilidade

Tem sido recomendada terapia antimicrobiana intramamária para o tratamento de mastite em ovinos (CONTRERAS *et al.*, 1995; NACCARI *et al.*, 2003). Contudo, existem poucos estudos realizados para determinar o perfil de sensibilidade aos fármacos empregados na mastite ovina. Além da escassez de estudos conduzidos nesta área, a indústria farmacêutica veterinária não disponibiliza produtos comerciais de uso exclusivo em pequenos ruminantes sendo que, para o tratamento de mastite na espécie ovina, são empregados antimicrobianos desenvolvidos para espécie bovina (NACCARI *et al.*, 2003).

As cefalosporinas, agentes β -lactâmicos, são bactericidas de amplo espectro, têm sua indicação frente às bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus*. Devido à falta de medicamentos para uso da espécie ovina, o cefalônio anidro tem sido recomendado para tratamento de mastite nesta espécie. Esta cefalosporina é aplicada por via intramamária no período seco, podendo ficar em atividade por até 10 semanas no tecido mamário, evidenciando diminuição nos casos da doença (COUTINHO, 2008).

Fármacos como a tetraciclina, por via intramuscular, podem apresentar resultados satisfatórios, devendo ser aplicadas duas doses com intervalos de três dias (VAZ, 1996). Também é recomendada a administração, via parenteral, de doses elevadas de penicilina e estreptomicina ou β -lactâmicos e macrolídeos. Ainda são recomendadas doses intramusculares de tobramicina, enrofloxacina ou norfloxacina (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; BERGONIER *et al.*, 2003).

BAGLITZ *et al.* (2011) ressaltam que os SCN podem desenvolver facilmente resistência a diferentes antimicrobianos, pois apresentam baixa susceptibilidade *in vitro* a estes medicamentos.

A eficiência da terapia antimicrobiana pode ser comprometida devido à escolha inadequada de antibióticos para o tratamento da doença, pois podem selecionar cepas resistentes aos fármacos empregados. O gênero *Staphylococcus* muitas vezes apresenta resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, pois apresentam um elemento genético móvel denominado *Staphylococcus casset Chromosome mec* (SCCmec), onde se encontra o gene *mecA* e seus reguladores que produzem a proteína ligadora de penicilina 2a (PBP2a) modificada que garante a resistência a todos os beta-lactâmicos (FITZGERALD *et al.*, 2001). A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibióticos, como oxacilina e cefoxitina (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Através do *California Mastitis Test* (CMT) foram identificadas 542 amostras de mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. Todos os isolados foram submetidos aos testes de susceptibilidade *in vitro* e os seguintes fármacos apresentaram melhor resultado no controle dos microrganismos: florfenicol, gentamicina e cefalexina (HARTMAN; BOLSANELLO; DOMINGUES, 2009).

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada em 121 isolados de SCN oriundos de ovelhas da raça Santa Inês. Todos os isolados apresentaram susceptibilidade a no mínimo um antimicrobiano. Alguns isolados apresentaram resistência múltipla, sendo que a resistência à sulfonamida foi a mais frequente (27,3%) e a menos frequente foi à gentamicina (1,6%). Alguns isolados apresentaram resistência à oxaciclina (14%). O perfil de resistência múltipla salienta a importância em determinar a resistência à oxaciclina, pois serve como indicativo da presença de ilhas de patogenicidade que contêm fatores de virulência e resistência a outros antimicrobianos (DELLA LIBERA *et al.*, 2010).

Novos protocolos de terapia precisam ser desenvolvidos devido à crescente resistência apresentada pelos micro-organismos isolados de mastite, sendo necessários testes de suscetibilidade para tratamento eficaz desta enfermidade em ovinos (GUARANÁ *et al.*, 2011).

3.6 Composição do leite de ovelha

A ovinocultura leiteira é bastante desenvolvida na região da Europa Mediterrânea, onde países como França, Espanha, Grécia e Itália representam 66% da produção mundial. Assim como em outros países, no Brasil, quase que a totalidade da produção de leite de ovelha é utilizada para produção de queijo finos devido à diferenciada composição e, em menor escala, de outros derivados lácteos, como iogurte (BOYAZOGLU; MORAND-FEHR, 2001).

O leite ovino contém mais sólidos totais e maior conteúdo nutricional quando comparado ao leite bovino e caprino (PARK; JUÁREZ; HAENLEIN, 2007). Os níveis elevados de caseína e gordura conferem a esta matéria-prima a capacidade de ser utilizado na elaboração de queijos com características peculiares e com alto valor de mercado, sendo considerados iguarias na gastronomia. Este leite não possui caroteno, produzindo derivados de cor branca acentuada. Possui ácidos graxos, tais como caprónico, caprílico e cáprico, que são de cadeia curta e média com 6 a 8 carbonos em sua estrutura (FERREIRA *et al.*, 2011).

A composição do leite ovino possui, em média, 7,6% de gordura, 4,6% de caseína, 4,7% de lactose, entre outros nutrientes (FERREIRA *et al.*, 2011), sendo que podem ocorrer variações na composição e na qualidade do leite ovino de acordo com a raça, idade, estágio de lactação, nível nutricional e técnica de ordenha (PEETERS *et al.*, 1992). Em ovelhas da raça Lacaune, oriundas de rebanho da região serrana do estado do Rio Grande do Sul, os teores médios de gordura, proteína e lactose foram 5,79%, 4,46% e 4,76%, respectivamente (BRITO *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 2

Avaliação de método microscópico para contagem de células somática em leite de ovelhas leiteiras

Avaliação de método microscópico para Contagem de Células Somáticas em leite de ovelhas leiteiras³

Cristiane da R. Moraes⁴, Tatiana R. Vieira², Verônica Schmidt^{2*}

(Artigo a ser submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira)

ABSTRACT.- Moraes C.R., Vieira T.R & Schmidt V. 2015. [**Microscopic evaluation method for somatic cell count in dairy sheep milk.**] Avaliação de método microscópico para contagem de células somática no leite de ovelhas leiteiras. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS 91.540-000, Brazil. E.mail: veronica.schmidt@ufrgs.br

Somatic Cells Count (SCC) is a diagnosis toll that indicates the mammary gland health and milk quality. The SCC can be determined by the automated method or the manual method, by the counting of cells under the microscope, whereupon there are discussions concerning the appropriated staining method to the ewe's milk. The current study aimed to identify and validate a methodology of microscopic count proper to ovine specie. Therefore, glass slides for smear were manufactured with 10 μ L of milk in 1 cm², and fixed with Carnoy solution and stained with Broadhurst-Paley (BP) in 47 sheep milk samples. The Carnoy's solution was elected, because this allowed a better fixation of the dairy film to the microscope slides, and the BP coloring, as this allowed a good coloration and visualization of cells and as well the differentiation of cytoplasmic corpuscles. The SCC values ranged from 2,6x10⁴ to 4,4x10⁶ cells.mL⁻¹ and from 1,9x10⁴ to 8,1x10⁶ cells.mL⁻¹, respectively, by automated and microscopic methods. The characteristics of BP coloration, as well as the equivalence of the counts results with the standard method (automated), demonstrate that this tool is applicable to the ovine specie.

INDEX TERMS: SCC, Broadhurst-Paley dyes, Lacaune.

RESUMO.- A Contagem de Células Somáticas (CCS) é uma ferramenta de diagnóstico indicativa da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite. A CCS pode ser determinada através de método automatizado e por método manual, através de contagem celular em microscópio, sobre o qual existem discussões quanto à coloração adequada ao leite de ovelhas. O presente estudo objetivou identificar uma metodologia de contagem microscópica adequada à espécie ovina. Para tanto, confeccionaram-se lâminas esfregaços de 10 μ L de leite em 1 cm², fixadas com solução de Carnoy e coradas com

³ Recebido em

Aceito para publicação em

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, nº 9090. Porto Alegre, 91.540-000 RS, Brasil. Autor para correspondência: veronica.schmidt@ufrgs.br

Broadhurst-Paley (BP), em 47 amostras de leite de ovelha. Elegeu-se a solução de Carnoy, pois esta permitiu uma melhor fixação do filme lácteo às lâminas de microscopia, e o corante BP, pois este permitiu uma boa coloração e visualização das células bem como a diferenciação dos corpúsculos citoplasmáticos. Os valores de CCS variaram de $2,6 \times 10^4$ a $4,4 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e de $1,9 \times 10^4$ a $8,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente, pelos métodos automático e microscópico. As características da coloração de BP, bem como a equivalência dos resultados das contagens ao método padrão (automatizado), demonstram que esta é uma ferramenta aplicável à espécie ovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: CCS, corante Broadhurst-Paley, Lacaune.

INTRODUÇÃO

A CCS, enquanto indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, é bastante estudada na espécie bovina (Viana et al. 2010), sendo escassos estudos realizados na espécie ovina (Baglitz et al. 2008). O leite de ovelha é uma secreção apócrina e apresenta partículas citoplasmáticas, as quais possuem tamanho e forma semelhante aos leucócitos que podem gerar certa confusão nos métodos automatizados de contagem celular (Madureira et al. 2010). O diagnóstico da mastite subclínica pode ser realizado através da contagem de células somáticas (CCS) que são estruturas de defesa do organismo frente à inflamação ou infecção e compostas por células do sistema imune (células somáticas) e células epiteliais (Summer, et al. 2012; Wickström et al. 2009).

A mastite é dos grandes problemas relacionados à produção leiteira, pois acarreta perdas econômicas decorrente da redução do volume de leite produzido e dos custos de tratamento e, até mesmo, a perda de animais. Embora bastante conhecida na espécie bovina, na espécie ovina os estudos acerca desta enfermidade são poucos (Baglitz et al. 2008).

Ainda existem discussões em relação à coloração utilizada para CCS mais adequada ao leite de pequenos ruminantes (Gomes et al. 2008). De acordo com a literatura, para CCS em ovinos existem diferentes protocolos de coloração específica para DNA, que são indicados por serem mais adequadas para pequenos ruminantes. Porém, a CCS realizada com colorações não específicas para DNA em ovinos pode ser uma ferramenta aplicável (Gomes et al. 2008; Viana et al. 2010).

O objetivo do presente estudo foi avaliar método de fixação e coloração não específica para DNA na contagem de células somáticas por microscopia óptica em leite ovino frente ao método automatizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo observacional longitudinal em um rebanho ovino com aptidão leiteira, composto por animais da raça Lacaune e mestiças, localizado na região Serrana do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29° 10' 15" S 51° 31' 08" O). A ordenha era realizada duas vezes ao dia; as fêmeas eram mantidas em pastagem nativa durante o dia e confinadas, durante a noite e encontravam-se em diferentes fases e número de lactações. A alimentação era complementada com concentrado preparado na propriedade a base de farelos de milho, girassol e trigo, óleo de soja, melação e sal mineral. Os animais recebiam, ainda, alfafa e água ad libitum.

No período de quatro meses, em intervalos mensais, avaliaram-se 123 ovelhas em lactação quanto à presença de sinais clínicos de mastite e coletaram-se amostras individualizadas por teto em frascos estéreis e identificados após assepsia com álcool 70% e desprezando-se o 1º jato de leite, (Pradiée et al. 2012; Santos et al. 2004), resultando em 315 amostras, as quais foram acondicionadas em caixas isotérmicas, transportadas e mantidas sob refrigeração até o processamento, 12 horas após a coleta. Sendo que do total de amostras coletadas, 47 foram utilizadas para a condução do estudo de metodologia.

Foram testados diferentes protocolos para este estudo, como corantes específicos para DNA, como May-Grünwald® (Laborclin, Paraná, Brasil) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante e com corantes não específicos para DNA, como Broadhurst-Paley (BP) (Baglitz et al. 2008; Barbosa et al. 2012). Também, foi avaliada a fixação do filme lácteo com xilol (Schalm et al. 1971) e com o fixador de Carnoy (Gomes et al. 2010).

Para este estudo foram utilizadas 47 amostras de leite ovino das quais 10 µL foram colocados sobre lâmina de vidro, apoiada sobre molde com área de 1 cm² e deixada em temperatura ambiente por 24 horas, para secagem (Schalm et al. 1971). Para fixação do filme lácteo foi empregada a solução de Carnoy, a qual é composta por etanol (60%), formol (30%), ácido acético (10%) (Puchtler et al. 1968). Para fixação das amostras, o fixador foi depositado sobre o filme lácteo durante dez minutos (Gomes et al. 2010), após as lâminas foram lavadas com água destilada pH 7,2 por um minuto e hidratadas durante com álcool 50% e 30%, nesta ordem, por um minuto (Arcuri et al. 2004; Filho 2012). A coloração das lâminas foi realizada com BP (Baglitz et al. 2008; Barbosa et al. 2012),

sendo que este foi depositado sobre o filme lácteo durante um minuto (Baglitz et al. 2008; Barbosa et al. 2012), a seguir as lâminas foram lavadas com água destilada pH 7,2 por um minuto e deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem (Arcuri et al. 2004).

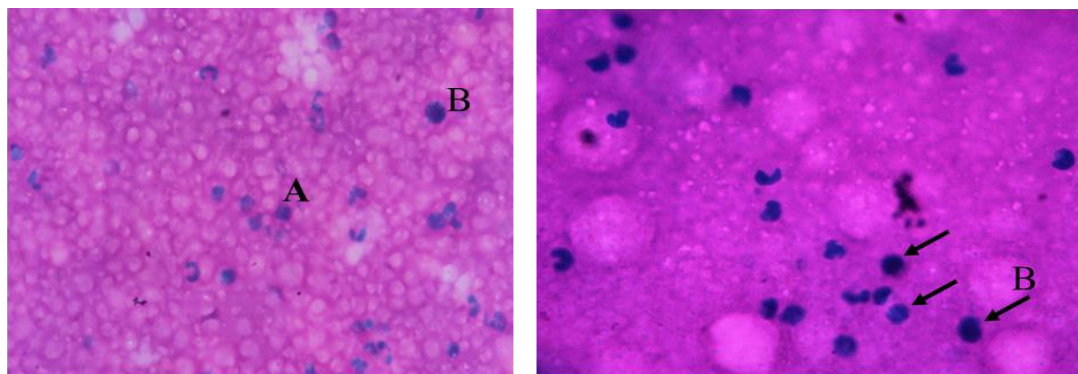
As lâminas obtidas foram observadas em microscópio óptico com óleo de imersão em aumento de 1000 vezes, onde foram observadas características como fixação do esfregaço à lâmina de microscopia e aparência geral das células. Visualizaram-se 25 campos, nas direções vertical e horizontal, para contagem celular (Schalm et al. 1971). A contagem de células encontrada em cada amostra foi multiplicada pelo fator de correção (FC = 3,6) específico do microscópio (modelo 40RF100, Olympus Optical CO - LTDA, Japão), sendo que o resultado obtido representa o número de células somáticas por mililitro de leite ovino (Baglitz et al. 2013).

Concomitante às coletas de leite para microscopia direta, foram coletadas amostras de cerca de 50 mL de leite ovino de cada, em frascos identificados de plástico estéril contendo conservante bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol). Após a coleta, os frascos foram homogeneizados até completa dissolução do conservante e armazenados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado (CPACT - Centro Agropecuário da Palma/Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS) que, através de citometria de fluxo determinou a CCS em equipamento de contagem optoeletrônico Bentley 2000 e Somacouting 300 Combi (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN).

Realizou-se análise descritiva das metodologias estudadas para a escolha daquela indicada para a espécie ovina. Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., San Diego, USA). Considerando-se o volume de leite utilizado em cada metodologia, a contagem de células por microscopia direta foi multiplicada por 100, para obter-se a contagem em mililitros de leite, nas duas metodologias. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores de CCS foram transformados em valores logarítmicos (Blagitz et al. 2013) e as comparações entre as médias da CCS automática e da CCS microscópica (com fixação por solução Carnoy e coloração de BP) foi realizada pelo teste de Mann Whitney, com nível de significância de 5%. A correlação entre CCS automática e BP foi determinada pela correlação de Spearman.

RESULTADOS

O conteúdo de gordura do leite ovino tornou a fixação das alíquotas nas lâminas uma etapa desafiadora, pois interferia na fixação da amostra às lâminas. O método eleito para retirada de gordura foi utilizando a solução de Carnoy, pois se apresentou de fácil execução, com menos etapas e menor tempo para realização da técnica. Também apresentou uma maior aderência do filme lácteo às lâminas de vidro, quando comparado ao xilol, o que refletiu em uma menor perda de amostras durante (16 %) a confecção das lâminas. O xilol, fixador muito utilizado em esfregaços lácteos bovinos, apresenta bom desempenho nesta espécie, mas a perda de amostras ainda foi alta em amostras de leite ovino. O enxague, a última etapa das colorações, apresentou-se como ponto crítico, pois as amostras, que pareciam estar fixadas, descolavam-se das lâminas e eram perdidas, quando utilizado o xilol. A coloração de BP apresentou uma melhor visualização e a possibilidade de uma diferenciação dos tipos celulares (Figura 1).

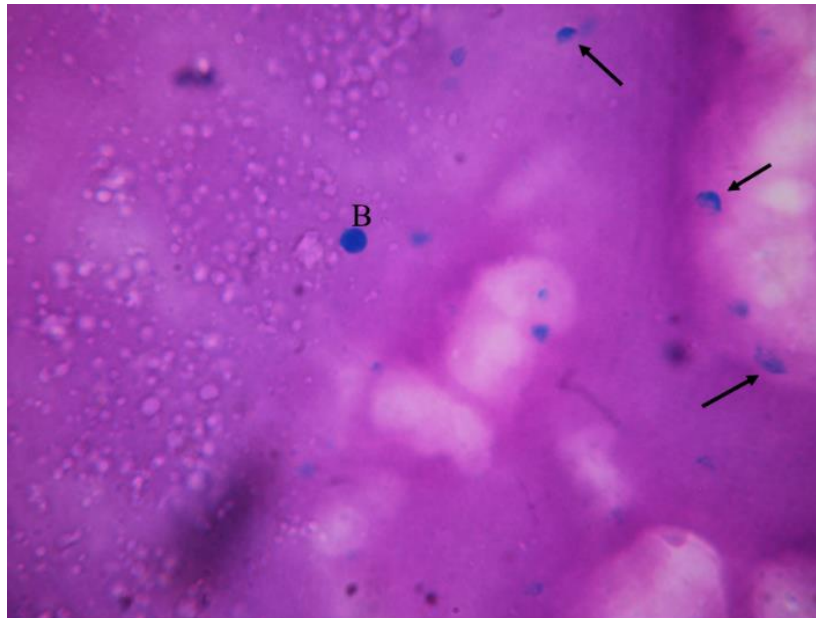


Esfregaço de leite ovino para contagem de células somáticas preparados com solução de Carnoy e corante Broadhurst-Paley evidenciando células mononucleares (A) e células polimorfonucleares (B)

Esfregaço de leite ovino para contagem de células somáticas preparados com solução de Carnoy e corante Broadhurst-Paley evidenciando células mononuclear (B).

Figura 1 – Esfregaço de leite ovino para contagem de células somáticas preparados com solução de Carnoy e corante BP, evidenciando células polimorfonucleares (A) e mononuclear (B).

Além de ter apresentado uma melhor distinção dos corpúsculos citoplasmáticos evitando que fossem, equivocadamente, incluídos na contagem celular (Figura 2).



Esfregaço de leite ovino para contagem de células somáticas preparados com solução de Carnoy e corante Broadhurst-Paley evidenciando corpúsculos citoplasmáticos (setas) e célula polimorfonuclear (B).

Figura 2: Lâmina confeccionadas com solução de Carnoy e coradas com BP, evidenciando corpúsculos citoplasmáticos (setas).

Os valores de CCS variaram de $2,6 \times 10^4$ a $4,4 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e de $1,9 \times 10^4$ a $8,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente pelos métodos automático e microscópico (Quadro 1).

Quadro 1: Valores logarítmicos da Contagem de Células Somáticas (CCS) em leite ovino, pelas metodologias automatizada e por microscopia direta.

Parâmetro	CCS EMBRAPA	CCS Microscopia
Mínimo	4,41	4,29
Percentil 25%	4,69	4,95
Mediana	5,27	3,11
Percentil 75%	5,88	5,61
Máximo	6,64	6,91

A transformação das contagens por microscopia direta de microlitros para mililitros resultou na proximidade das contagens entre as duas metodologias, indicando equivalência entre as duas metodologias (Figura 3).

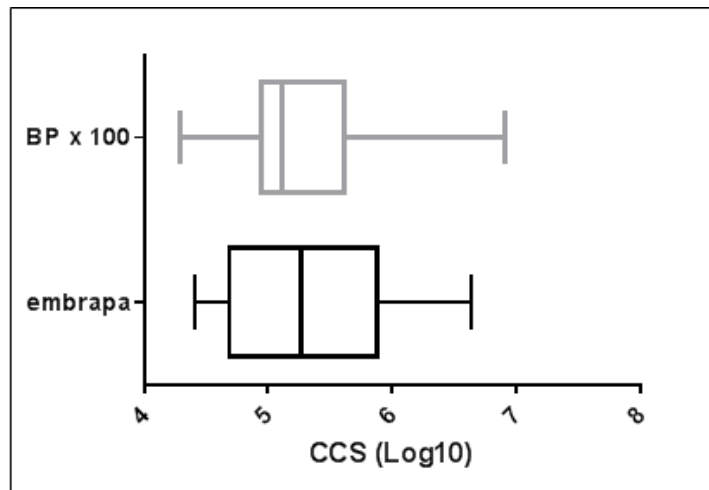


Figura 3: Box plot das contagens de células somáticas (CCS) pelo método automático (em 1mL), comparativamente ao método microscópico com correção (BP x 100), determinada em 1mL.

Determinou-se correlação moderada ($r=0,6810$) entre as duas metodologias. Aplicando-se modelos de regressão, o modelo linear foi o que apresentou maior coeficiente de correlação ($r=0,5247$) (Figura 4).

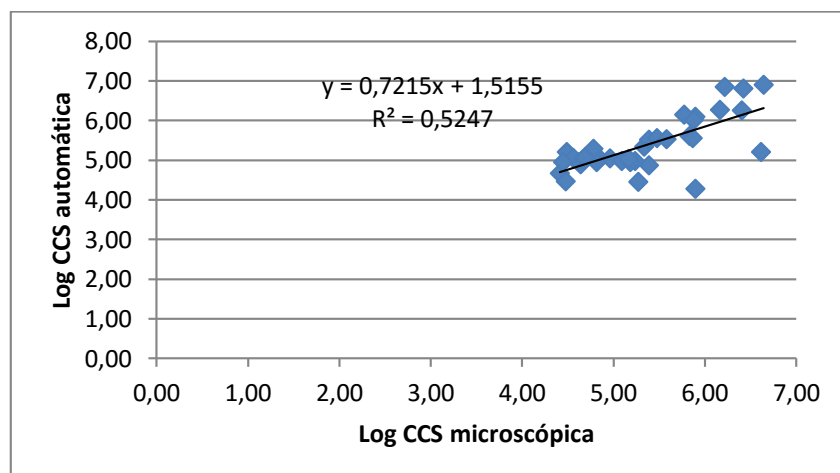


Figura 4 - Curva de regressão linear entre as contagens de células somáticas (CCS) pelo método automatizado e por microscopia direta.

DISCUSSÃO

Ainda existe muita discussão em torno de qual coloração é mais indicada para determinação de CCS em pequenos ruminantes. O emprego de CCS, automatizada ou manual, é uma ferramenta de baixo custo para diagnóstico de mastite e de execução relativamente simples.

Existe uma grande variação dos valores de CCS em ovelhas. Esta variação pode ser influenciada por inúmeros fatores como mastites não infecciosas, estresse, fase de lactação, idade, número de lactação, raça, estado nutricional dos animais (Contreras et al. 1995; Fthenakis, 1994; Leitner et al. 2003; Madureira et al. 2010; Pengov, 2001; Souza et al. 2012)

Barbosa et al. (2012) realizaram a comparação da técnica automatizada com a técnica de microscopia usando BP e obtiveram resultados de CCS maiores na contagem manual quando comparada à automatizada. Gomes et al. (2010) e Baglitz et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes utilizando corantes não específicos para DNA em leite ovino, quando comparada à CCS automatizada. Os autores afirmam, ainda, que o método empregado na contagem celular de leite ovino tem influência sobre a CCS, embora tenham encontrado resultados semelhantes quando compararam as técnicas.

Duzentas amostras de leite oriundos de 100 ovelhas da raça Lacaune em diferentes fases de lactação foram estudadas. Deste total, 184 (92%) não apresentaram crescimento, 14 (7%) apresentaram crescimento microbiano, 2 (1%) estavam contaminadas. Na CCS automatizada, foram obtidos valores médios nas amostras sem crescimento de $0,115 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e $0,113 \times 10^6$ células.mL⁻¹, para aquelas com crescimento. Concomitante, foi realizada a CCS por microscopia direta com coloração de Rosenfeld e verde de metil e pironina-Y, cujos valores, respectivamente, foram $0,126$ e $0,320 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e $0,127$ e $0,851 \times 10^6$ células.mL⁻¹, para amostras negativas e positivas, mostrando diferença significativa entre 2 grupos (Gomes et al. 2008).

Existe a possibilidade de utilização de diversos protocolos de coloração para CCS em pequenos ruminantes. No entanto, a presença de corpúsculos citoplasmáticos determina que sejam empregadas colorações específicas para o DNA, como verde de metil e pironina-Y ou May-Grünwald, que são mais laboriosas. Viana et al. (2010), utilizando a coloração de BP e o Panótico® afirmaram que estas não foram adequadas

em amostras de leite de bovinos, pois provocaram muitas alterações na morfologia celular. Entretanto, no presente estudo o BP possibilitou a diferenciação de polimorfonucleares e mononucleares presentes no leite de ovelha, comparadas às colorações não específicas para o DNA. Em animais da raça Lacaune foi observado que a utilização da coloração com verde de metil e pironina-Y foi a ideal, porém seu alto potencial carcinogênico torna a sua utilização limitada (Baglitz et al. 2013).

A CCS por microscopia direta em leite ovino ainda é pouco estudada e necessita de maior atenção. Como este estudo demonstrou equivalência entre os dois métodos de CCS torna-se possível que a CCS por microscopia, em ovinos, seja uma alternativa para áreas afastadas dos centros de referência com equipamentos específicos para realização da CCS automatizada. A escolha da metodologia tornou-se valiosa para este estudo, pois possibilitou a fixação e coloração das amostras de forma bastante satisfatória. A utilização do fixador de Carnoy mostrou-se eficiente no seu propósito, minimizando perdas excessivas das amostras por falta de aderência. A opção por uma coloração não específica para o DNA tornou-se adequada à realidade do laboratório, de fácil execução e facilitou a contagem celular quando comparada a outros métodos.

REFERÊNCIAS

- Arcuri, E., Silva, P.D., Brito, J.R.F., Silva, M.R. & Souza, G.N. 2004. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. *Ciência Rural* 34: 1497–1500.
- Baglitz, M.G., Batista, C.F., Souza, F.N., Benites, N.R., Melville, P.A., Stricagnolo, C.R., Ricciardi, M., Gomes, V., Azedo, M.R., Sanches, B.G.S. & Della Libera, A.M.M.P. 2008. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesqui. Vet. Bras.* 28, 417–422.
- Baglitz, M.G., Benites, N.R., Batista, C., Souza, F.N., Dias, R.A., Gomes, V. & Della Libera, A.M.M. 2013. Variações metodológicas na contagem de células somáticas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. *Ciência Rural* 43: 668–671.
- Barbosa, D.A., Baglitz, M.G., Batista, C.F., Gomes, V., Souza, F.N., Benites, R.N. & Della Libera, A.M.M.P. 2012. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o Broadhurst-palley e Hematoxilina-eosina. *Ciência Anim.* 22: 17–23.
- Contreras, A., Corrales, J.C., Sierra, D. & Marco, J. 1995. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Res.* 17: 71–78.

- Fthenakis, G.C., 1994. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. *Small Rumin. Res.* 13: 293–300.
- Gomes, V., Amato, A.L., Ponte, G.C.T., Blagitz, M., Madureira, K.M. & Della Libera, A.M.M.P. 2010. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o rosenfeld e verde de metil e pironina-y. *Ciência Anim. Bras.* 11: 162–167.
- Gomes, V., Baglitz, M.G., Madureira, K.M. & Della Libera, A.M.M.P. 2008. Avaliação da contagem de células somáticas (CCS) para diagnóstico de infecção mamária em ovelhas da raça lacaune. *Ensaio e Ciência XII*, 163–170.
- Leitner, G., Chaffer, M., Caraso, Y., Ezra, E., Kababea, D., Winkler, M., Glickman, A. & Saran, A. 2003. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition - Fat, protein and lactose - In Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Rumin. Res.* 49: 157–164.
- Madureira, K.M., Gomes, V., de Castro, R.S., Kitamura, S.S. & de Araújo, W.P. 2010. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas. *Pesqui. Vet. Bras.* 30: 311–316.
- Pengov, A., 2001. The role of coagulase-negative Staphylococcus spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 84: 572–574.
- Puchtler, H., Waldrop, F.S., Conner, H.M. & Terry, M. 1968. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *Histochemie* 16: 361–371.
- Schalm, O.W., Carrol, E.J. & Jain, N.C. 1971. *Bovine mastitis*. Philadelphia, PA.
- Souza, F.N., Blagitz, M.G., Penna, C.F.A.M., Della Libera, A.M.M.P., Heinemann, M.B. & Cerqueira, M.M.O.P. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Rumin. Res.* 107: 65–75.
- Summer, A., Malacarne, M., Sandri, S., Formaggioni, P. & Mariani, P. 2012. Effects of somatic cell count on the gross composition, protein fractions and mineral content of individual ewe's milk. *African J. Biotechnol.* 11: 16377–16381.
- Viana, K.F., Setubal, B.F., Mendes, V.A., Grasse, P.A.P. & Zanini, M.S. 2010. Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. *Acta Vet. Bras.* 4: 59–63.
- Wickström, E., Persson-Waller, K., Lindmark-Månsson, H., Ostensson, K. & Sternesjö, A. 2009. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *J. Dairy Res.* 76: 195–201.

CAPÍTULO 3

Caracterização da mastite subclínica em ovelhas leiteiras

Caracterização da mastite subclínica em ovelhas leiteiras

Cristiane da Rosa Moraes¹, Tatiana Regina Vieira¹, Amanda Dias de Oliveira¹,
Verônica Schmidt^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

(Artigo a ser submetido para Small Ruminant Research).

*Autor para correspondência: Tel: + 55-51- 3308-6123; Fax: +55-51-3308-7305;
email: veronica.schmidt@ufrgs.br

ABSTRACT.- Mastitis is a major problem related to breeding of dairy sheep due to the economic losses arising from the reduction in production, expenditure on medication and loss of animals. The Somatic Cell Count (SCC) and bacterial isolation are diagnostic tools indicative of mammary gland's health. The aim of this study was to determine the occurrence of subclinical mastitis in dairy sheep flock, through bacterial isolation and SCC. It was determined also the milk composition (fat, lactose, protein and total solids) and the relationship between these parameters and the presence of mastitis. To do so, 315 milk samples were collected, individualized per teat, from which 85 (27%) were identified as subclinical mastitis and *Staphylococcus* coagulase negative (CNS) was the prevalent agent (64.7 %), followed by *Staphylococcus* coagulase positive (19.1 %). The SCC ranged from 2,5x10³ to 9,3x10⁶. There was significant higher SCC ($p < 0.0001$) in samples with bacterial isolation. However, the same was not observed between the composition parameters. There was no correlation between the composition parameters and SCC. The CNS are the most prevalent etiologic agents associated with subclinical mastitis in dairy ewes and their presence correlates with high SCC. However, the limits for SCC and milk composition for ovine species still have to be investigated.

Keywords: subclinical mastitis; dairy ewes, SCC

RESUMO. _A mastite um dos grandes problemas relacionados com criação de ovinos de leite devido às perdas econômicas decorrentes da redução na produção, gastos com medicamento e perdas de animais. A Contagem de Células Somáticas (CCS) e o isolamento bacteriano são ferramentas diagnósticas indicativas da saúde da glândula mamária. O objetivo do presente estudo foi determinar a ocorrência de mastite subclínica em rebanho ovino leiteiro, através do isolamento bacteriano e da CCS. Determinou-se, ainda, a composição (gordura, lactose, proteína e sólidos totais) do leite e a relação entre estes parâmetros e a presença de mastite. Para tanto, coletaram-se 315 amostras de leite,

individualizadas por teto, das quais 85 (27%) foram identificadas como mastite subclínica, sendo *Staphylococcus* coagulase negativas o agente prevalente (64,7%), seguido por *Staphylococcus* coagulase positivas (19,1%). A CCS variou de $2,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Verificou-se CCS significativamente maior ($p < 0,0001$) nas amostras com isolamento bacteriano. Entretanto, o mesmo não foi observado entre os parâmetros de composição. Não foi determinada correlação entre os parâmetros de composição e a CCS. Os SCN são os agentes etiológicos mais prevalentes relacionados com mastite subclínica em ovelhas leiteiras e sua presença tem correlação com CCS elevada. No entanto, os limites de CCS e a composição do leite para a espécie ovina ainda precisam ser investigados.

Palavras chave: mastite subclínica, ovelhas leiteiras, CCS

1. Introdução

Um dos maiores entraves à criação de ovinos leiteiros é a sanidade da glândula mamária, sendo a mastite um dos grandes problemas relacionados com esta atividade. Esta enfermidade é responsável por perdas econômicas importantes, uma vez que, em pequenos ruminantes, a mastite pode resultar em queda de produção láctea até 30% e 58%, respectivamente, em cabras e ovelhas (GONZALO *et al.*, 2002; LEITNER *et al.*, 2004), além do descarte prematuro de animais, morte de cordeiros e custos com tratamentos (FTHENAKIS; JONES, 1990; NUNES *et al.*, 2008).

No Brasil, embora os estudos sejam escassos, estima-se que a mastite subclínica, em ovinos e caprinos, tenha prevalência entre cinco a 30% (PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010).

Estudos sugerem que espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) sejam os agentes mais frequentes na mastite em ovinos (BARILLET *et al.*, 2001; BERGONIER; BERTHELOT, 2003; DALL AGNOL *et al.*, 2013; OLIVES *et al.*, 2013; SANTANA *et al.*, 2013; TEJADA *et al.*, 2012). Estes microrganismos fazem parte da microbiota normal da pele e, de forma oportunista, podem causar infecção na glândula mamária. Sua habilidade em formar biofilmes os torna capaz de se manterem em equipamentos utilizados na ordenha e nas mãos dos ordenadores, facilitando sua disseminação (EL-JAKEE *et al.*, 2013).

Para realização do diagnóstico de mastite, podem ser utilizados métodos diretos (isolamento do agente etiológico) e indiretos (contagem de células somáticas – CCS) (BARBOSA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2008). Contudo, existe escassez de informações sobre a CCS em ovelhas (GOMES *et al.*, 2008).

O presente estudo tem como objetivo determinar a ocorrência de mastite subclínica, através do isolamento bacteriano e da CCS, e determinar a relação entre a composição

(gordura, lactose, proteína e sólidos totais) do leite e a presença de mastite em ovelhas leiteiras.

2. Materiais e Métodos

Realizou-se um estudo observacional longitudinal em um rebanho ovino com aptidão leiteira, composto por animais da raça Lacaune e mestiças, localizado na região Serrana do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29° 10' 15" S 51° 31' 08" O) (Figura 1). A ordenha era realizada duas vezes ao dia; as fêmeas eram mantidas em pastagem nativa durante o dia e confinadas, durante a noite. A alimentação era complementada com concentrado preparado na propriedade a base de farelos de milho, girassol e trigo, óleo de soja, melação e sal mineral. Os animais recebiam, ainda, alfafa e água *ad libitum*.



Figura 1- Localização do local de estudo.

No período de quatro meses, em intervalos mensais, avaliaram-se 123 ovelhas em lactação quanto à presença de sinais clínicos de mastite e coletaram-se amostras assépticas de leite, individualizadas por teto (PRADIEÉ *et al.*, 2012; SANTOS; SCHERER; SCHMIDT, 2004), resultando em 315 amostras, as quais foram acondicionadas em caixas isotérmicas, transportadas e mantidas sob refrigeração até o processamento, 12 horas após a coleta.

Para o isolamento bacteriano, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi inoculada na superfície de ágar acrescido de 5% de sangue ovino e incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas. A identificação presuntiva dos microrganismos foi baseada nas características morfotintoriais e bioquímicas (MACFADDIN, 2000). Considerou-se mastite as amostras de leite que apresentaram crescimento de, pelo menos, cinco unidades formadoras de colônia (UFC) e até

dois tipos morfológicos. Amostras com mais de dois tipos morfológicos foram caracterizadas como contaminadas e foram excluídas da análise (CONTRERAS *et al.*, 1997).

Em 93 amostras, também foram coletadas cerca de 50 mL de leite ovino de cada teto, em frascos contendo conservante bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), as quais foram encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da EMBRAPA Clima Temperado (CPACT) que, através de citometria de fluxo determinou a CCS e a composição das amostras em equipamento de contagem optoeletrônico (Bentley 2000, Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN). Para este estudo amostras que apresentaram valores de CCS acima de $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹, foram consideradas positivas para mastite (FRAGKOU; BOSCO; FTHENAKIS, 2014; PRADIEÉ *et al.*, 2012).

Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., San Diego, USA). A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores de CCS foram transformados em valores logarítmicos. As comparações entre as medianas da CCS e dos parâmetros de composição em amostras com e sem mastite subclínica pela lactocultura foi realizada pelo teste de Mann Whitney, com nível de significância de 5%. A correlação entre CCS e composição foi determinada pela correlação de Spearman. A relação entre as metodologias de isolamento bacteriano e CCS para diagnóstico de mastite subclínica foi realizada pelo teste exato de Fischer e determinação de kappa, com nível de significância de 5%.

3. Resultados

Verificou-se ausência de sinais clínicos compatíveis com mastite em todas as ovelhas amostradas. Entretanto, em 64 (52%) fêmeas verificou-se crescimento bacteriano na cultura láctea sendo que destas, seis (9,4%) apresentaram cultura láctea positiva em duas amostragens consecutivas. Do total (315) de amostras de leite analisadas, em 85 (27%) verificou-se crescimento bacteriano. Identificaram-se *Staphylococcus* coagulase negativas (SCN) em 55 (64,7%) amostras e *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) em 13 (19,1%) amostras, sendo que destes, seis isolados foram identificados como *S. aureus*. Em nove amostras o microrganismo não foi recuperado da subcultura, não sendo viável sua identificação.

Considerando o total de amostras, a CCS variou de $2,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^6$. Entretanto, verificou-se CCS significativamente maior ($p < 0,0001$) nas amostras com isolamento

bacteriano. Entretanto, o mesmo não foi observado entre os parâmetros de composição (Tabela 1). Não foi determinada correlação entre os parâmetros de composição e a CCS.

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros de composição do leite de ovelhas com e sem mastite subclínica, pelo método de lactocultura.

Parâmetro	Com mastite	Sem mastite	Valor de p
Log CCS	5,87 ^a \pm 0,70	4,92 ^b \pm 0,42	0,0001
Gordura (%)	4,94 \pm 1,64	5,29 \pm 1,90	0,5992
Proteína (%)	5,01 \pm 0,48	5,01 \pm 0,47	0,8767
Lactose (%)	4,68 \pm 0,23	4,65 \pm 0,23	0,3219
Sólidos totais (%)	15,52 \pm 1,64	15,82 \pm 0,70	0,6691

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa

Determinou-se uma associação significativa ($p < 0,0001$) entre o isolamento bacteriano e a CCS no diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas, em decorrência dos diagnósticos concordantes (74,67%) entre as duas metodologias. Verificou-se que apenas uma amostra apresentou elevada CCS e isolamento bacteriano negativo. Entretanto, 18 amostras negativas no isolamento bacteriano (sem mastite subclínica) apresentaram elevada CCS, resultando em baixa concordância ($k=0,383$) entre os dois métodos.

4. Discussão

Os SCN são os agentes etiológicos mais prevalentes em casos de mastite subclínica em ovelhas leiterias (DALL AGNOL *et al.*, 2013; OLIVES *et al.*, 2013; SANTANA *et al.*, 2013; TEJADA *et al.*, 2012). A mastite subclínica por SCN tem sido relacionada ao aumento de CCS em ovelhas (PENGOV, 2001).

Por diferentes motivos, em quase 50% dos casos de mastite (MAKOVEC; RUEGG, 2003) existe a possibilidade que o agente etiológico não seja isolado: (i) eliminação de número reduzido de agente ou de forma intermitente; (ii) agente que não podem ser isolados pelos métodos usuais (como *Mycoplasma* sp. e vírus da Maedi-Visna em ovinos) (PAAPE *et al.*, 2007); (iii) presença de enzimas como lisozima e lactoferina

podem interferir na detecção do patógeno; (iv) presença de endotoxinas bacterianas (MCDOUGALL *et al.*, 2001; PYÖRÄLÄ, 2003). Tal fato poderia explicar o elevado número de amostras com elevada CCS e negativas na lactocultura no presente estudo.

Considerando estes fatores, embora o isolamento bacteriano seja, normalmente, considerado o método padrão para infecções de origem bacteriana, a CCS tem sido indicada para detecção de mastite, demonstrando aumento da celularidade no leite. No entanto, certos pontos relacionados à CCS em leite de ovelhas não estão bem definidos, como o ponto de corte para indicação de infecção. Embora inúmeras pesquisas apresentem valores de referência para CCS em ovelhas, ainda assim observa-se grande variação inclusive para a mesma raça (FRAGKOU; BOSCO; FTHENAKIS, 2014). Nesta espécie, valores de CCS inferiores a $0,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹ são considerados fisiológicos para glândula mamária sadia (BAGLITZ *et al.*, 2008; BERGONIER; BERTHELOT, 2003; GONZALO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012); valores entre $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹, são sugestivos de mastite, sendo indicada a realização de lactocultura; valores de CCS individual superiores a $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ confirmam que glândula mamária apresenta-se com mastite nas formas subclínica ou clínica (FRAGKOU; BOSCO; FTHENAKIS, 2014). Porém, mesmo contagens de $0,25 \times 10^6$ células.mL⁻¹ já podem ser interpretadas como mastite subclínica (ARIZNABARRETA; GONZALO; PRIMITIVO, 2002).

Em estudo conduzido nos EUA com 245 ovelhas, demonstraram que ovelhas com valores de CCS iguais ou superiores 400×10^3 células.mL⁻¹, em 3 coletas consecutivas, apresentaram maior predisposição (5,6 a 7,5 vezes) a terem isolamento positivo para agentes etiológicos de mastite do que aquelas com valores inferiores a este limite (SPANU *et al.*, 2011).

Em Israel foram testadas amostras de leite de ovelha e os SCN foram os isolados mais prevalentes, corroborando os resultados do presente estudo. A presença de SCN nas amostras aumentou a CCS em $1,2 \times 10^6$ células.mL⁻¹, o que está de acordo com o estudo de LEITNER *et al.* (2003).

Nos Estados Unidos foram analisadas amostras de leite de ovelhas da raça Lacaune e mestiças, sendo que em 71,5% das amostras não houve crescimento bacterianos. Os SCN apresentaram a maior prevalência (45%) entre as amostras com crescimento (SPANU *et al.*, 2011).

Em São Paulo, foram analisadas 390 amostras de leite de ovelhas Santa Inês. Na prova bacteriológica foram observadas 296 amostras (75,9%) negativas e 94 (24,1%) positivas, sendo que destas, em 94,7% foram isoladas bactérias *Staphylococcus* sp., e em 5,3%, *Streptococcus* sp. (NUNES *et al.*, 2008). Ambos trabalhos apresentam proximidade com o resultado obtido no presente estudo, onde de 315 amostras, 230 (73%) não apresentaram crescimento. Das 87 amostras (27,44%) com crescimento, *Staphylococcus* sp. foi isolado em 70 (80,46%).

O leite ovino apresenta em sua composição, em média, 7,6% de gordura, 4,6% de caseína, 4,7% de lactose, entre outros nutrientes (FERREIRA *et al.*, 2011), sendo que podem ocorrer variações na composição e na qualidade do leite ovino de acordo com a raça, idade, estágio de lactação, nível nutricional e técnica de ordenha (PEETERS *et al.*, 1992). Em ovelhas da raça Lacaune, oriundas de rebanho da região serrana do estado do Rio Grande do Sul, os teores médios de gordura, proteína e lactose foram 5,79%, 4,46% e 4,76%, respectivamente (BRITO *et al.*, 2006).

Os SCN são os agentes etiológicos mais prevalentes relacionados com mastite subclínica em ovelhas leiteiras e sua presença tem correlação com CCS elevada. Não foi possível estabelecer uma associação entre valores elevados de CCS e a composição. No entanto, os limites de CCS e a composição do leite para a espécie ovina ainda precisam ser investigados.

Referências

ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; PRIMITIVO, F. S. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 6, p. 1370–1375, 2002.

BAGLITZ, M. G. *et al.* Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 9, p. 417–422, 2008.

BARBOSA, D. A. *et al.* Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o Broadhurst-palley e Hematoxilina-eosina. *Ciência Animal*, v. 22, n. 3, p. 17–23, 2012.

BARILLET, F. *et al.* Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genetics, selection, evolution : GSE*, v. 33, p. 397–415, 2001.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, v. 79, p. 1–16, 2003.

BRITO, M. A. *et al.* Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, v. 36, p. 942–948, 2006.

CONTRERAS, A. *et al.* Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *Journal of dairy science*, v. 80, n. 11, p. 2815–2819, 1997.

DALL AGNOL, A. M. *et al.* Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 1, p. 311–322, 2013.

EL-JAKEE, J. K. *et al.* Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 1, p. 74–78, 2013.

FERREIRA, M. I. C. *et al.* Produção e composição do leite de ovelhas Santa Inês e mestiças Lacaune e Santa Inês e desenvolvimento de seus cordeiros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 530–533, 2011.

FRAGKOU, I. A.; BOSCOS, C. M.; FTHENAKIS, G. C. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*, v. 118, n. 1-3, p. 86–92, 2014.

FTHENAKIS, G. C.; JONES, J. E. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of comparative pathology*, v. 102, p. 211–219, 1990.

GOMES, V. *et al.* Avaliação da contagem de células somáticas (CCS) para diagnóstico de infecção mamária em ovelhas da raça lacaune. *Ensaio e Ciência*, v. XII, n. 2, p. 163–170, 2008.

GONZALO, C. *et al.* Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 6, p. 1460–1467, 2002.

LEITNER, G. *et al.* Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 46–52, 2004.

LEITNER, G. *et al.* Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition - Fat, protein and lactose - In Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, v. 49, p. 157–164, 2003.

MACFADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteriae*. 3 ed ed. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *International Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 11, p. 3466–3472, 2003.

MCDUGALL, S. *et al.* Relationships among somatic cell count, california mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, v. 40, n. 3, p. 245–254, 2001.

NUNES, G. R. *et al.* Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 75, n. 3, p. 271–278, 2008.

OLIVES, A. M. DE *et al.* Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 12, p. 7698–7708, 2013.

PAAPE, M. J. *et al.* Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 114–125, 2007.

PEETERS, R. *et al.* Milk yield and milk composition of Flemish milksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. *Small Ruminant Research*, v. 7, n. 4, p. 279–288, 1992.

PEIXOTO, R. D. M.; MOTA, R. A.; DA COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010.

PENGOV, A. The role of coagulase-negative Staphylococcus spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of dairy science*, v. 84, n. 3, p. 572–574, 2001.

PRADIEÉ, J. *et al.* Somatic cell count and California mastitis test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in Ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n. 2, p. 1–7, 2012.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, v. 34, p. 565–578, 2003.

SANTANA, R. C. M. *et al.* Occurrence of Etiologic Agents Causing Subclinical Mastitis in Morada Nova and Santa Ines Ewes. *Ars Veterinária, Jaboticabal, SP*, v. 29, n. 3, p. 148–152, 2013.

SANTOS, A. .; SCHERER, S.; SCHMIDT, V. Validação da Contagem de Células Somáticas e do Califórnia Mastitis testes como método diagnóstico para mamite em caprinos. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 3, n. 1, p. 50–55, 2004.

SOUZA, F. N. *et al.* Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research*, v. 107, p. 65–75, 2012.

SPANU, C. *et al.* Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 97, n. 1-3, p. 139–145, 2011.

TEJADA, T. S. *et al.* Mastite subclínica por Staphylococcus coagulase negativa em ovinos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, p. 1074–1076, 2012.

CAPÍTULO 4

Identificação genotípica de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) isolados de leite ovino e perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Identificação genotípica de *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) isolados de leite ovino e perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Cristiane da Rosa Moraes¹, Tatiana Regina Vieira¹, Amanda Dias de Oliveira¹, Priscila Guerra¹, Verônica Machado¹, Graciela Volz Lopes¹, Verônica Schmidt^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

(Artigo a ser submetido para Veterinary Microbiology).

*Autor para correspondência: Tel: + 55-51- 3308-6123; Fax: +55-51-3308-7305; email: veronica.schmidt@ufrgs.br

ABSTRACT

The ovine mastitis has been reported as one of the main factors that affect the milk and dairy products and the *Staphylococcus coagulase negative* (CNS) is the main etiological agent. The identification of these microorganisms at the species level is essential for effective prophylactic measures. The molecular identification of CNS, based on the DNA sequence is more accurate than the phenotypic identification methods and is considered the gold standard method for identifying these agents. This study aimed to identify the species of CNS in 32 isolated from cases of subclinical mastitis in sheep by PCR -RFLP and sequencing of the gap gene, and determine the susceptibility of isolates face to nine antimicrobial agents, through the agar disk diffusion technique. Four profiles were obtained in sequencing, revealing the presence of three species CNS: *Staphylococcus epidermidis* (59.4%), *Staphylococcus chromogenes* (34.4%) and *Staphylococcus devriesei* (6.2%), first time described in the south region of the country in cases of sheep mastitis. All isolates were susceptible to cephalothin, ceftiofur and penicillin+novobiocin. Twenty-one isolates (65.6%) showed resistance to at least one antimicrobial agent and eleven isolates (34.4%) were susceptible to all tested agents. Four isolates (12.5%) had multidrug resistance and, among these, an isolated *S. epidermidis* was resistant to oxacillin, confirmed by amplifying the *mecA* gene by PCR. Besides being an animal health problem, arising in economic losses to producers, CNS have zoonotic potential highlighting the importance of these microorganisms in public health, becoming crucial to identify these agents through secure and reliable genotypic tools.

Keywords: genotypic identification, CNS, sheep milk, susceptibility profile

RESUMO

A mastite ovina tem sido relatada como um dos principais fatores que afetam a produção leite e derivados e tem nos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) os principais agentes etiológicos, sendo que a identificação destes microrganismos em nível de espécie é imprescindível para efetividade de medidas profiláticas. A identificação molecular de SCN, baseados na sequência de DNA, apresenta maior acurácia do que os métodos de identificação fenotípica, sendo considerado o método padrão-ouro para identificação destes agentes. O presente estudo teve como objetivos identificar as espécies de SCN em 32 isolados de casos de mastite subclínica em ovinos, através da técnica de PCR-RFLP e sequenciamento do gene *gap*, e determinar a suscetibilidade dos isolados frente a nove agentes antimicrobianos, pela técnica de disco difusão em ágar. Foram obtidos quatro perfis no sequenciamento, sendo observada a presença de três espécies de SCN: *Staphylococcus epidermidis* (59,4%), *Staphylococcus chromogenes* (34,4%) e *Staphylococcus devriesei* (6,2%), pela primeira vez descrita na região Sul do país em casos de mastite ovina. Todos os isolados foram suscetíveis a cefalotina, ceftiofur e penicilina+novobiocina. Vinte e um isolados (65,6%) apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano e onze isolados (34,4%) mostraram-se suscetíveis a todos os agentes testados. Quatro isolados (12,5%) apresentaram multirresistência e, entre estes, um isolado da espécie *S. epidermidis* apresentou resistência à oxacilina, confirmada através da amplificação do gene *mecA* por PCR. Além de se constituir em problema de sanidade animal, repercutindo em perdas econômicas ao produtor, SCN possuem potencial zoonótico destacando a importância destes microrganismos na saúde pública, tornando primordial a identificação destes agentes, através de ferramentas genotípicas seguras e confiáveis.

Palavras-chave: identificação genotípica, SCN, leite ovino, perfil de suscetibilidade

Introdução

A mastite, causada por *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), tem sido relatada como um dos principais fatores que afetam a produção leite e derivados na espécie ovina (Barillet et al., 2001; Bergonier; Berthelot, 2003; Dall Agnol et al., 2013; El-Jakee et al., 2013; Kiossis et al., 2013; Olives et al., 2013; Onni et al., 2010; Santana et al., 2013). Na forma subclínica, esta enfermidade apresenta-se imperceptível, exceto pela redução persistente na produção leiteira, que pode chegar a 50% do volume diário (Kiossis et al., 2013). No Brasil, estima-se que a mastite subclínica em pequenos ruminantes tenha prevalência entre cinco a 30%, embora os dados de ocorrência da enfermidade sejam pouco relatados no país (Peixoto et al., 2010b).

Devido ao aumento significativo de casos envolvendo SCN, sua identificação em nível de espécie torna-se imprescindível. Diferentes métodos de diagnóstico podem ser empregados para detecção da mastite sugerindo-se que este seja acompanhado de provas de suscetibilidade aos antimicrobianos para estabelecimento de terapia adequada (Peixoto et al., 2010a). A identificação molecular de SCN, baseados na sequência de DNA, apresenta maior

acurácia do que os métodos de identificação fenotípica, sendo considerado o método padrão-ouro para identificação destes agentes (Hosseinzadeh; Dastmalchi Saei, 2014; Santos et al., 2008). Entre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) para amplificação do gene *gap* (*glyceraldehydo-3-phosphato deshydrogenase*), acompanhada da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polimorphysm - RFLP*), tem sido o método de eleição. O gene *gap* é responsável por codificar a proteína ligadora de transferrina (42 KDa), que localiza-se na parede celular de *Staphylococcus* e é considerado um gene conservado neste gênero bacteriano (Ghebremedhin et al., 2008). O emprego de PCR-RFLP para a amplificação do gene *gap*, tem sido considerado de fácil execução e seus resultados mais confiáveis e reprodutíveis para diferenciação das 28 espécies de SCN (Hosseinzadeh e Dastmalchi Saei, 2014; Onni et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivos identificar as espécies de SCN em isolados de leite ovino, através da técnica de PCR-RFLP e sequenciamento do gene *gap*, e determinar a suscetibilidade dos isolados frente a agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

Origem dos isolados

Um total de 32 isolados de SCN de casos de mastite subclínica ovina foi incluído nesse estudo. Os isolados foram obtidos previamente de uma propriedade de rebanho ovino com aptidão leiteira, composto por animais da raça Lacaune e mestiças, localizada na região serrana do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (artigo 2 tese).

Após a identificação presuntiva dos microrganismos, apoiada nas características morfotintoriais, prova da catalase e prova da coagulase (Markey et al., 2013), os isolados foram armazenados a - 20°C em caldo *Brain Heart Infusion - BHI* (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) acrescidos de 20% de glicerol (Nuclear, São Paulo, Brasil) (Macfaddin, 2000) para posterior identificação das espécies de SCN.

Extração do DNA

Para extração de DNA foi utilizado o kit de extração NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Resumidamente, os isolados foram inoculados em caldo BHI por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, 1 mL da cultura bacteriana

foi centrifugado por 5 minutos a 8,000xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido. Foram adicionados 2 μ L de lisostafina (0,2 mg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e as amostras incubadas, por 60 minutos, a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 25 μ L de proteinase K (5 mg/mL) e as amostras incubadas a 56°C, *overnight*. As demais etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração.

PCR-RFLP

Para identificação e diferenciação das espécies de SCN utilizou-se a técnica de PCR-RFLP de acordo com protocolo descrito por ONNI *et al.* (2010). O gene alvo da amplificação por PCR foi *glyceraldehydo-3-phosphato deshydrogenase (gap)*. Os oligonucleotídeos GF1 (5'- ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA - 3') e GR-2 (5' - GACATTTTCGTTATCATACCAAGCTG-3') amplificaram um fragmento de 933 pares de bases, equivalente ao gene *gap*. A reação de PCR foi realizada com volume final de 50 μ L contendo: 5 μ L de tampão 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 3,75 mM de dNTP, 75 pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo, 0,5 U/ μ L de Taq polimerase e 5 μ L de DNA. A amplificação foi conduzida em termociclador automatizado (Veriti 96 well – Applied Biosystems, Foster City, CA) com desnaturação inicial a 94°C, por 2 minutos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 20 segundos; anelamento a 55°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 40 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C, por 5 minutos. Para separação dos produtos de PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Para a técnica de RFLP, 15 μ L do produto da PCR foram submetidos a uma reação de digestão contendo 1 μ L de tampão 10X, 1 μ L da endonuclease de restrição AluI (10U/ μ L – Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura estéril, para completar o volume de 20 μ L. As amostras foram incubadas por 16 horas a 37°C. Os fragmentos de DNA digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Após esta etapa, o gel foi corado com brometo de etídio, descorado em água e fotografado sob luz ultravioleta.

Sequenciamento do DNA

Os isolados que apresentaram diferentes perfis na técnica de PCR - RFLP foram purificados com *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*, conforme as instruções do fabricante (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Um isolado representativo de cada perfil

foi selecionado e enviado para sequenciamento na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre) utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). As reações de marcação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster, EUA) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C, por 1 minuto; seguida de 35 ciclos de 96°C, por 15 segundos; 50°C por, 15 segundos e 60°C, por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye X Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster, EUA) e eletroinjetadas no sequenciador automático. As sequências obtidas do gene *gap* foram comparadas com as sequências depositadas no Genbank. Sequências com similaridade acima de 98% ($\geq 98\%$) foram consideradas pertencentes à espécie de SCN (Lange et al., 2015).

Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade dos isolados frente aos agentes antimicrobianos foi determinado pelo método de disco difusão em ágar, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, conforme o documento VET01-S2 (CLSI, 2013). Os isolados foram inoculados em TSA e incubados a 37°C, por 24 horas. De três a cinco colônias foram transferidas para solução salina até obtenção de turvação compatível com a escala 0,5 de MacFarland. Com auxílio de suabe estéril, os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (MH, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Logo após, foram aplicados discos impregnados com os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg) (AMP), eritromicina (15µg) (ERI), cefalotina (30µg) (CFT), ceftiofur (30µg) (CEF), oxacilina (1µg) (OXA), penicilina (10UI) (PEN), penicilina/novobiocina (10UI/40µg) (PEN/NOV), pirlimicina (2 µg) (PIR) e tetraciclina (30µg) (TET). As placas foram incubadas por 16 a 18 horas a 35°C. *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foi utilizada como cepa controle nos testes. Após a leitura dos halos foi determinado o perfil de suscetibilidade dos isolados (CLSI, 2013).

Resultados

Na identificação genotípica das espécies de SCN, todos os 32 isolados apresentaram amplificação de um fragmento de 933 pb correspondente ao gene *gap* através da técnica de PCR. Os produtos da PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease *AluI* e quatro diferentes perfis (P1, P2, P3 e P4) de restrição foram observados (Figura 1A).

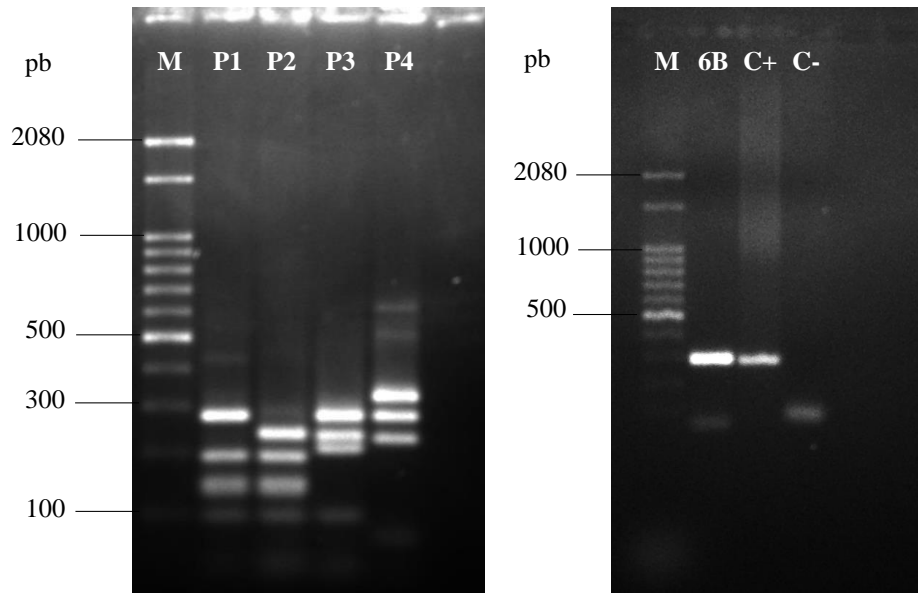


Figura 1. A (esquerda). Perfis obtidos na técnica de PCR-RFLP do gene *gap* de quatro isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativa provenientes de amostras de leite ovino após a digestão com a endonuclease de restrição *AluI*. M: marcador de 100 pb (Ludwig). P1: *S. epidermidis*. P2: *S. epidermidis*. P3: *S. devriesei*. P4: *S. chromogenes*. **B. (direita)** Amplificação do gene *mecA* através da técnica de PCR em um isolado de *S. epidermidis* resistente a oxacilina. M: marcador de 100 pb (Ludwig). 6B: isolado de *S. epidermidis* positivo para o gene *mecA*. C+: controle positivo. C-: controle negativo utilizando água ultra-pura estéril no lugar do DNA.

Os perfis P1 e P4 foram os perfis que abrigaram um maior número de isolados com 18 e 11 isolados em cada perfil, respectivamente. Dentre os quatro perfis, submetidos ao sequenciamento, foi possível observar a presença de três espécies de SCN: *Staphylococcus epidermidis* (59,4%), *Staphylococcus chromogenes* (34,4%) e *Staphylococcus devriesei* (6,2%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação das espécies de SCN provenientes de mastite subclínica ovina através do sequenciamento do gene *gap*

Perfil na PCR-RFLP	N.º de isolados	Espécie identificada	Similaridade	Sequência referência no GenBank
P1	18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98%	CP009046.1
P2	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	HG813242.1
P3	2	<i>Staphylococcus devriesei</i>	98%	KM251711.1
P4	11	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	100%	JQ728521.1

Dois perfis da PCR-RFLP, P1 e P2, foram identificados como *S. epidermidis*. O perfil P1, representando 18 isolados, apresentou 98% de similaridade com a sequência de *S. epidermidis* cepa AmMS 205 (Número de Acesso: **CP009046.1**), a qual foi identificada como agente causal de septicemia relacionada ao uso de cateter em pacientes humanos, nos Estados Unidos (Davenport et al., 2014). O perfil P2, no entanto, identificado em apenas um isolado, apresentou 100% de similaridade com *S. epidermidis* cepa PM221 originária de bovinos na Finlândia (Número de Acesso: **HG813242.1**). O sequenciamento de um isolado do perfil P3, observado em dois isolados, revelou a espécie *Staphylococcus devriesei*, com 98% de similaridade com *S. devriesei* cepa F101 proveniente de mastite bovina na Argentina (Número de Acesso: **KM251711.1**). O perfil P4, representando 11 isolados de SCN, demonstrou pertencer à espécie *Staphylococcus chromogenes* com 100% de similaridade com *S. chromogenes* cepa ZLT-1 isolada de suínos na China (Número de Acesso: **JQ728521.1**).

As espécies de SCN foram, ainda, submetidas ao teste de suscetibilidade frente a nove agentes antimicrobianos de seis diferentes classes. Vinte e um isolados (65,6%) apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano e onze isolados (34,4%) foram suscetíveis a todos os agentes testados (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de resistência aos agentes antimicrobianos entre isolados SCN provenientes de mastite subclínica ovina

Classes dos agentes antimicrobianos	Agentes antimicrobianos - concentração	Número de isolados resistentes (%)	
		<i>S. epidermidis</i> (n=19)	<i>S. chromogenes</i> (n=11)
β-Lactâmicos	Ampicilina (AMP) - 10µg	9 (47,4%)	1 (9,1%)
	Oxacilina (OXA) - 1µg	1 (5,3%)	0
Cefalosporinas	Cefalotina (CFT) - 30µg	0	0
	Ceftiofur (CEF) - 30µg	0	0
Lincosamida	Pirlimicina (PIR) - 2µg	1 (5,3%)	0
Macrolídeo	Eritromicina (ERI) - 15µg	1 (5,3%)	0
Penicilina	Penicilina (PEN) - 10UI	9 (47,4%)	0
	Penicilina+Novobiocina (PEN/NOV) - 10UI/40µg	0	0
Tetraciclina	Tetraciclina (TET) - 30µg	16 (84,2%)	1 (9,1%)

Quatro isolados (12,5%) foram classificados como multirresistentes, ou seja, resistentes a três ou mais classes de agentes antimicrobianos. Dentre os multir-resistentes, um isolado (3,12%) apresentou resistência a cinco antimicrobianos (ampicilina, eritromicina, oxacilina, penicilina e pirlimicina), enquanto outros três isolados (9,4%) apresentaram resistência a três antimicrobianos (ampicilina, penicilina e tetraciclina) (Tabela 3). Não foi observada resistência a cefalotina, ceftiofur e penicilina+novobiocina. Verificou-se que um isolado multi-resistente, da espécie *S. epidermidis*, que apresentou resistência à oxacilina na técnica de disco difusão em ágar (halo = 0 mm), teve a resistência confirmada através da amplificação do gene *mecA* por PCR (Figura 1B).

Tabela 3 – Perfil de PCR-RFLP e perfil de resistência aos agentes antimicrobianos em isolados de SCN provenientes de mastite subclínica ovina

Perfil na PCR-RFLP (Espécie identificada)	Identificação dos isolados (n=32)	Perfil de resistência
P1 (<i>S. epidermidis</i>)	37D	AMP-PEN-TET
	28EB	
	40DA	
	44DA	AMP-PEN
	23EB	
	7	AMP-TET
	29D	
	9E	
	3E	PEN-TET
	40DB	
39D		

	11E	
	22E	
	23EA	TET
	9DB	
	29E	
	28EA	
	24D	
P2 (<i>S. epidermidis</i>)	6B	AMP-ERI-OXA-PEN-PIR
	9B	PEN
P3(<i>S. devriesei</i>)	18A	Suscetível
	6A	AMP-TET
P4 (<i>S. chromogenes</i>)	31	Suscetível
	35A	Suscetível
	05	Suscetível
	30EA	Suscetível
	34	Suscetível
	35B	Suscetível
	43E	Suscetível
	44DB	Suscetível
	44E	Suscetível
	51D	Suscetível

Discussão

A identificação das espécies de *Staphylococcus* é baseada, em sua maioria, no sequenciamento dos primeiros 500 pb do gene 16S rRNA. No entanto, a utilização desta sequência para identificação de espécies de SCN pode tornar-se difícil devido à elevada similaridade desta sequência entre as espécies (Lange et al., 2015). A utilização do gene *gap* pode ser empregada como alternativa na caracterização de isolados nos quais não houve possibilidade de serem atribuídas a uma espécie com base na identificação fenotípica convencional e de forma mais eficaz do que a análise com gene 16S rRNA (Ghebremedhin et al., 2008). O desenvolvimento de uma PCR-RFLP utilizando o gene *gap* como alvo foi proposto para a identificação genotípica de 226 isolados de SCN de ovelhas da raça Sarda que apresentavam mastite subclínica na Itália (Onni et al., 2010). O emprego desta ferramenta molecular de identificação apresentou maior confiabilidade e reprodutibilidade quando comparada a métodos baseados em caracteres fenotípicos, como o API Staph ID. No presente estudo, a técnica foi aplicada com sucesso em 32 isolados de SCN, sendo possível a amplificação do gene *gap* em todos os isolados e a geração de perfis de restrição discriminatórios utilizando a endonuclease AluI (Figura 1A).

Atualmente, mais de 15 espécies de SCN já foram relacionadas com mastite bovina, sendo *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus* as espécies mais comumente identificadas (Hosseinzadeh and Dastmalchi Saei, 2014). Em ovinos, diversos estudos apontam que a causa mais comum de mastite deve-se as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (Barillet et al., 2001; Bergonier; Berthelot, 2003; Dall Agnol et al., 2013; El-Jakee et al., 2013; Kioussis et al., 2013; Olives et al., 2013; Onni et al., 2010; Santana et al., 2013). A taxa de prevalência de SCN em ovelhas com infecção intramamária pode variar de 25 a 93% (Bergonier and Berthelot, 2003). Na pesquisa da prevalência e etiologia de casos de mastite subclínica em ovelhas Awassi, no nordeste da Jordânia, 278 amostras de leite foram coletadas e analisadas. Nestas amostras, o principal agente causal de mastite subclínica foi *Staphylococcus* (69,2%), sendo que SCN representaram 56,9% destes isolados (Alekish and Alshehabat, 2014).

Entre as espécies de SCN, *S. epidermidis* é o patógeno mais frequentemente isolado de mastite ovina (Bergonier and Berthelot, 2003; Marogna et al., 2010). Essa informação corrobora com os dados encontrados no presente estudo, em que *S. epidermidis* foi identificado em 59,4% dos isolados. Este agente bacteriano está frequentemente associado com infecções em pacientes humanos e o fato de um isolado proveniente de leite ovino apresentar 98% de homologia com o DNA de uma cepa causadora de septicemia em pacientes humanos, destaca o possível potencial zoonótico desta espécie e sua importância em saúde pública.

Staphylococcus chromogenes, a segunda espécie mais frequente (34,4%) no presente estudo, foi a espécie de SCN prevalente (58,3%) em ovelhas leiteiras da raça Chio, na Grécia (Kioussis et al., 2013). *Staphylococcus chromogenes* é, também, responsável por mastite subclínica em cabras e, após *S. caprae* e *S. epidermis*, foi a terceira espécie mais prevalente no estudo de (Contreras et al., 1995).

Outras espécies de SCN, além de *S. epidermidis* e *S. chromogenes*, podem ser relatadas como mais prevalentes causando mastite subclínica em ovinos. No Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, *Staphylococcus* foi isolado em 29,5% (26/88) das amostras de leite de ovelhas com mastite e *S. lentus* foi a espécie mais prevalente (26,9%), observada em sete amostras (Tejada et al., 2012). Os autores identificaram, ainda, outras espécies de SCN como *S. sciuri* (19,2%), *S. vitulinus* (7,7%), *S. haemolyticus* (3,8%) e *S. epidermidis* (3,8%).

No Estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, em amostras de leite ovino foram identificados *Staphylococcus* sp., sendo 15,1% dos isolados identificados como *S. aureus* e 84,9% como SCN. *Staphylococcus devriesei* foi isolado em 60% das amostras

de leite ovino, sendo oito isolados de animais saudáveis e quatro de animais com mastite subclínica (Martins, 2013). No presente estudo, dois isolados (6,2%) de SCN foram identificados, através de sequenciamento do gene *gap*, como pertencente à espécie *S. devriesei*, com homologia superior a 98%. Pelo que se sabe, até o momento, este é o primeiro relato de *S. devriesei* proveniente de mastite subclínica ovina na região Sul do Brasil.

Staphylococcus devriesei foi isolado, inicialmente, de vacas leiteiras na Bélgica e Holanda e, posteriormente, relatado em outros países (Supré et al., 2010). Na Itália, Onni et al. (2012) identificaram, através de PCR-RFLP e sequenciamento, dois (1,40%) (2/143) isolados pertencentes à espécie *S. devriesei* em leite de cabra, os quais haviam sido previamente identificados como *S. auriculares* pelo API *Staph* ID. Recentemente, a presença de *S. devriesei* foi relatada, pela primeira vez, em rebanho ovino leiteiro na Escócia. A identificação genotípica desta espécie foi realizada através de *Real Time* PCR e sequenciamento do gene *rpoB*. No total de 21 isolados de *Staphylococcus* sp., apenas 1 (4,8%) foi confirmado por sequenciamento como pertencente à espécie *S. devriesei*, com homologia superior a 97% (Zadoks et al., 2014).

A terapia com agentes antimicrobianos tem um importante papel para o controle da mastite estafilocócica ovina clínica e subclínica. No entanto, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos está associado com a emergência de cepas bacterianas resistentes. Como a terapia com agentes antimicrobianos é a abordagem principal para o controle da mastite ovina, os 32 isolados de SCN foram submetidos ao teste de suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Maior percentual de resistência foi observado frente a ampicilina, tetraciclina e penicilina (Tabela 3). A resistência a essas classes é comumente relatada em outros estudos abordando SCN. Elevado percentual de resistência à ampicilina e penicilina em isolados de ovinos foi relatado por Tejada et al. (2012), com 73,1% e 69,2% respectivamente. Na Itália, a resistência à penicilina foi observada em 38,2% dos isolados de SCN obtidos de amostras de leite ovino (Onni et al., 2011). No mesmo país, Viridis et al. (2010) reportaram 36% dos isolados apresentando resistência à ampicilina.

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um importante patógeno na medicina humana, mas também pode colonizar e infectar uma ampla variedade de espécies animais. A resistência à meticilina também tem sido relatada em isolados de SCN (Fessler et al., 2010; Onni et al., 2011). No presente estudo, um isolado multi-resistente de *S. epidermidis* demonstrou resistência à oxacilina na técnica de disco difusão em ágar e foi positivo o gene *mecA* na técnica de PCR. A resistência à classe dos β -lactâmicos, em *Staphylococcus*, é

mediada por β -lactamases do tipo BlaZ ou pelo gene *mecA* que codifica uma proteína alternativa de ligação a penicilina PBP2a. A presença do gene *mecA* reduz a ligação nas células bacterianas de todos os agentes antimicrobianos β -lactâmicos disponíveis para tratamento da mastite em animais (Aarestrup, 2005). A prevalência de cepas SCN resistentes à meticilina é bastante variável. Sampinon et al. (2011) relataram 30% dos isolados de *S. epidermidis* provenientes de bovinos leiteiros como portadores do gene *mecA*. No Brasil, Silva et al. (2013) encontraram 6,2% dos isolados SCN de bovinos com mastite resistentes à meticilina. Em amostras de leite ovino, provenientes de animais com mastite, 1,5% (2/131) dos isolados de *S. epidermidis* foram resistentes à meticilina (Onni et al., 2011). A possibilidade da transmissão de isolados de SCN resistentes à meticilina entre animais e humanos pode ser um risco potencial à saúde pública e merece atenção.

Em conclusão, a técnica de PCR-RFLP utilizando o gene *gap* como alvo, provou ser uma ferramenta molecular confiável e reprodutível na discriminação das espécies de SCN obtidos a partir de episódios de mastite subclínica em ovelhas leiteiras. A presença de SCN resistentes a agentes antimicrobianos serve de alerta quanto ao uso indiscriminado destes agentes em sistemas de produção ovina. Somado a isso, ovinos colonizados com isolados de SCN resistentes à meticilina podem transmitir esses microrganismos para humanos e atuar como veículos de disseminação de bactérias resistentes no ambiente.

Referências

- Aarestrup, F.M., 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 271–281.
- Alekish, M.O., Alshehabat, M.A., 2014. The prevalence and etiology of subclinical mastitis in awassi sheep; emphasis on the relationship between the isolated organisms and the somatic cell count. *Eur. J. Vet. Med.* 8, 1–13.
- Barillet, F., Rupp, R., Mignon-Grasteau, S., Astruc, J.-M., Jacquin, M., 2001. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genet. Sel. Evol.* 33, 397–415.
- Bergonier, D., Berthelot, X., 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest. Prod. Sci.* 79, 1–16.
- Contreras, A., Corrales, J.C., Sierra, D., Marco, J., 1995. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Res.* 17, 71–78.
- Dall Agnol, A.M., Cavalcante, M.B., De França, C.A., Da Costa Krewer, C., De Queiros, A.A., Da Costa, M.M., Bragança, J.F.M., Girardini, L.K., 2013. Caracterização

fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. *Semin. Agrar.* 34, 311–322.

- Davenport, K.W., Daligault, H.E., Minogue, T.D., Bishop-lilly, K.A., Broomall, S.M., Bruce, D.C., Chain, P.S., Coyne, S.R., 2014. Complete Genome Assembly of *Staphylococcus epidermidis* AmMS 205. *Genome Announc.* 2, 5–6.
- El-Jakee, J.K., Aref, N.E., Gomaa, A., El-Hariri, M.D., Galal, H.M., Omar, S. a., Samir, A., 2013. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 1, 74–78.
- Fessler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K., Schwarz, S., 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1576–1582.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B., 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1019–1025.
- Hosseinzadeh, S., Dastmalchi Saei, H., 2014. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2, 27–34.
- Kiossis, E., Brozos, C.N., Petridou, E., Zdragas, a., Papadopoulos, T., Boscós, C., 2013. Study on the possible survival of *Staphylococcus chromogenes* through the dry period in dairy ewes. *Small Rumin. Res.* 115, 124–129.
- Lange, C.C., Brito, M. a. V.P., Reis, D.R.L., Machado, M. a., Guimarães, A.S., Azevedo, A.L.S., Salles, É.B., Alvim, M.C.T., Silva, F.S., Meurer, I.R., 2015. Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Vet. Microbiol.* 176, 382–388.
- Marogna, G., Rolesu, S., Lollai, S., Tola, S., Leori, G., 2010. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Rumin. Res.* 88, 119–125.
- Martins, K.B., 2013. Virulência e determinação da resistência em *Staphylococcus* spp . isolados de leite ovino caracterização do perfil clonal , fatores de virulência e determinação da resistência em *Staphylococcus* spp . isolados de leite ovino.
- Olives, A.M. De, Diaz, J.R., Molina, M.P., Peris, C., 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *J. Dairy Sci.* 96, 7698–7708.
- Onni, T., Sanna, G., Cubeddu, G.P., Marogna, G., Lollai, S., Leori, G., Tola, S., 2010. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Vet. Microbiol.* 144, 347–352.
- Onni, T., Sanna, G., Larsen, J., Tola, S., 2011. Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 148, 45–50.

- Onni, T., Vidili, a., Bandino, E., Marogna, G., Schianchi, S., Tola, S., 2012. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from caprine milk samples by PCR-RFLP of groEL gene. *Small Rumin. Res.* 104, 185–190.
- Peixoto, R.D.M., de França, C. a., de Souza Júnior, A.F., Veschi, J.L. a, da Costa, M.M., 2010a. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 735–740.
- Peixoto, R.D.M., Mota, R.A., da Costa, M.M., 2010b. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 754–762.
- Sampimon, O.C., Lam, T.J.G.M., Mevius, D., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., 2011. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* 150, 173–179.
- Santana, R.C.M., Zafalon, L.F., Esteves, S.N., Tanaka, E. V, Pilon, L.E., Massa, R., 2013. Occurrence of Etiologic Agents Causing Subclinical Mastitis in Morada Nova and Santa Ines Ewes. *Ars Veterinária, Jaboticabal, SP* 29, 148–152.
- Santos, O.C.D.S., Barros, E.M., Brito, M.A.V.P., Bastos, M.D.C.D.F., dos Santos, K.R.N., Giambiagi-deMarval, M., 2008. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. *Vet. Microbiol.* 130, 134–140.
- Silva, N.C.C., Guimarães, F.F., Manzi, M.P., Budri, P.E., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C., 2013. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *J. Dairy Sci.* 96, 6856–62.
- Supré, K., De Vlieghe, S., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Van Trappen, S., Piepers, S., Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., De Vos, P., Haesebrouck, F., 2010. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2739–2744.
- Tejada, T.S., Silva, D.T., Dias, P. a., Conceição; R.C.S., Müller Neto, H., Timm, C.D., 2012. Mastite subclínica por *Staphylococcus coagulase negativa* em ovinos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 64, 1074–1076.
- Virdis, S., Scarano, C., Cossu, F., Spanu, V., Spanu, C., De Santis, E.P.L., 2010. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from goats with subclinical mastitis. *Vet. Med. Int.* 2–5.
- Zadoks, R.N., Tassi, R., Martin, E., Holopainen, J., McCallum, S., Gibbons, J., Balligall, K.T., 2014. Comparison of bacteriological culture and PCR for detection of bacteria in ovine milk — Sheep are not small cows. *J. Dairy Sci.* 97, 6326–6333.

CONCLUSÕES

Com relação aos objetivos da tese listados no capítulo 1, é possível concluir que:

- a) A utilização do fixador de Carnoy e a coloração de BP podem ser utilizadas para confecção de lâminas para CCS manual, pois mostraram capacidade de fixação e distinção das estruturas presentes no leite
- b) A CCS manual com corante não específico ao DNA é alternativa para o método automatizado, e sua aplicabilidade merece atenção, principalmente nos locais afastados dos centros de referência para realização de CCS automatizada, pois apresentou equivalência dos resultados das contagens ao método padrão (automatizado), demonstrando que a CCS manual é uma ferramenta aplicável à espécie ovina.
- c) Os SCN são os agentes etiológicos mais prevalentes relacionados com mastite subclínica em ovelhas leiteiras e sua presença tem correlação com CCS elevada.
- d) A identificação genotípica dos SCN através da técnica de PCR-RFLP e sequenciamento do gene *gap*, permitiu a correta identificação destes agentes. A identificação destes micro-organismos é importante do ponto de vista da saúde pública.
- e) Os SCN apresentam perfil de multirresistência aos antimicrobianos, além de evidenciarem a presença do gene de resistência.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, F. R., CARVALHO, L. B., BRITO, J. R. F., SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 29, n. 2, p. 101–105, 2005.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Ars Veterinaria*, v. 25, n. 3, p. 129–135, 2009.
- ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* Occurrence of coagulase-positive Staphylococcus in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control*, v. 18, n. 6, p. 630–634, 2007.
- ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; PRIMITIVO, F. S. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 6, p. 1370–1375, 2002.
- BAGLITZ, M. G. *et al.* Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 28, n. 9, p. 417–422, 2008.
- BAGLITZ, M. G. *et al.* Variações metodológicas na contagem de células somáticas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. *Ciência Rural*, v. 43, n. 4, p. 668–671, 2013.
- BARBOSA, D. A. *et al.* Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o Broadhurst-palley e Hematoxilina-eosina. *Ciência Animal*, v. 22, n. 3, p. 17–23, 2012. Disponível em:
- BARILLET, F. *et al.* Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genetics, selection, evolution : GSE*, v. 33, n. 4, p. 397–415, 2001.
- BERGONIER, D. *et al.* Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, p. 689–716, 2003.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, v. 79, p. 1–16, 2003.
- BOYAZOGLU, J.; MORAND-FEHR, P. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: A critical review. *Small Ruminant Research*, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2001.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite.* . Brasília, DF: 39p , 2002.

BRITO, M. A. *et al.* Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, v. 36, p. 942–948, 2006.

BUENO, V. F. F. *et al.* Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, v. 35, n. 4, p. 848–854, 2005.

CASSOL, D. M. S. *et al.* Mastite bovina. *A Hora Veterinária*, v. 29, n. 175, p. 27–31, 2010.

CONTRERAS, A. *et al.* Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 68, n. 1-2, p. 145–153, 2007.

CONTRERAS, A. *et al.* Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Ruminant Research*, v. 21, n. 3, p. 259–264, 1996.

CONTRERAS, A. *et al.* Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research*, v. 17, n. 1, p. 71–78, 1995.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 7, n. 2, p. 139–151, 2006.

DALL AGNOL, A. M. *et al.* Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 1, p. 311–322, 2013.

DELLA LIBERA, A. M. M. P. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from meat-producing ewes with mastitis. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 0, p. 1499–1502, 2010.

DOMINGUES, P. F. *et al.* Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. *Ars Veterinaria*, v. 22, n. 2, p. 146–152, 2006.

EL-JAKEE, J. K. *et al.* Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 1, p. 74–78, 2013.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus*. *Ciência Rural*, v. 34, n. 0103-8478, p. 1315–1320, 2004.

FERREIRA, M. I. C. *et al.* Produção e composição do leite de ovelhas Santa Inês e mestiças Lacaune e Santa Inês e desenvolvimento de seus cordeiros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 530–533, 2011.

FITZGERALD, J. R. *et al.* Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome

epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 15, p. 8821–8826, 2001.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo - SP: [s.n.], 2000.

FRAGKOU, I. A.; BOSCO, C. M.; FTHENAKIS, G. C. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*, v. 118, n. 1-3, p. 86–92, 2014.

FTHENAKIS, G. C. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. *Small Ruminant Research*, v. 13, p. 293–300, 1994.

FTHENAKIS, G. C.; JONES, J. E. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of comparative pathology*, v. 102, p. 211–219, 1990.

GOMES, V. *et al.* Avaliação da contagem de células somáticas (CCS) para diagnóstico de infecção mamária em ovelhas da raça lacaune. *Ensaio e Ciência*, v. XII, n. 2, p. 163–170, 2008.

GOMES, V. *et al.* Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o rosenfeld e verde de metil e pironina-y. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 1, p. 162–167, 2010.

GONZALO, C. *et al.* Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 6, p. 1460–1467, 2002.

GUARANÁ, E. *et al.* Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 31, n. 10, p. 851–858, 2011.

HARTMAN, M.; BOLSANELLO, R. X.; DOMINGUES, P. F. Califórnia Mastitis Test. p. 213–220, 2009.

HOSSEINZADEH, S.; DASTMALCHI SAEI, H. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 2, n. 1, p. 27–34, 2014.

JORGE, A. M. *et al.* Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2039–2045, 2005.

LANGE, C. C. *et al.* Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, v. 176, p. 382–388, 2015..

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina : seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2006.

LEITNER, G. *et al.* Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 46–52, 2004. Disponível em:

LEITNER, G. *et al.* Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition - Fat, protein and lactose - In Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, v. 49, p. 157–164, 2003.

MADUREIRA, K. M. *et al.* Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 311–316, 2010.

MARKEY, B. *et al.* *Clinical Veterinary Microbiology*. 2^a ed. Mosby-Elsevier, Philadelphia, PA, 921p., 2013.

MAVROGIANNI, V. S. *et al.* Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, v. 27, n. 1, p. 115–120, 2011.

MCDUGALL, S. *et al.* Relationships among somatic cell count, california mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, v. 40, n. 3, p. 245–254, 2001.

MENDONÇA, E. C. L. *et al.* Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 9, p. 859–864, 2012.

MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 17, n. 2, p. 333–358, 2001.

MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos 1. *Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 2, n. 3, p. 57–61, 2008.

NACCARI, F. *et al.* Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. *Small Ruminant Research*, v. 47, n. 1, p. 1–9, 2003.

NUNES, G. R. *et al.* Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 75, n. 3, p. 271–278, 2008.

OLECHNOWICZ, J. *et al.* Connection of somatic cell count and milk yield as well as composition in dairy ewes. *Archiv Tierzucht*, v. 53, n. 1, p. 95–100, 2010.

OLIVES, A. M. DE *et al.* Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 12, p. 7698–7708, 2013.

ONNI, T. *et al.* Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Veterinary Microbiology*, v. 144, n. 3-4, p. 347–352, 2010.

PAAPE, M. J. *et al.* Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 114–125, 2007.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v. 68, n. 1-2, p. 73–87, 2007.

PEETERS, R. *et al.* Milk yield and milk composition of Flemish milksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. *Small Ruminant Research*, v. 7, n. 4, p. 279–288, 1992.

PEIXOTO, R. D. M. *et al.* Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 9, p. 735–740, 2010.

PEIXOTO, R. D. M.; MOTA, R. A.; DA COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010.

PELISSER, M. *et al.* Occurrence of staphylococcus aureus and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 145–148, 2009.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 171–175, 2001.

PODKOWIK, M. *et al.* Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, v. 163, p. 34–40, 2013.

PRADIEÉ, J. *et al.* Somatic cell count and California mastitis test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in Ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n. 2, p. 1–7, 2012.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 7, p. 632–640, 1910.

PRESTES, S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam - uma revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia - Puc Uruguaiana*, v. 9, n. 1, p. 118–132, 2002.

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

RADOSTIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. Mastite. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. [S.l: s.n.], 2002. p. 541–629.

RIET-CORREA, F. *et al.* Mastite ovina. In: VARELA (Org.). *Doenças de ruminantes e equinos*. 3^a ed ed.São Paulo -SP, 2007. p. 716.

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

SAMPIMON, O. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology*, v. 150, n. 1-2, p. 173–179, 2011..

SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. *Bovine mastitis*. Philadelphia, PA.: 780p, 1971.

SOUZA, F. N. *et al.* Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research*, v. 107, p. 65–75, 2012. SPANAMBERG, A. *et al.* Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*, v. 39, p. 282–290, 2009.

SPANU, C. *et al.* Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 97, n. 1-3, p. 139–145, 2011. Disponível em:

SUMMER, A. *et al.* Effects of somatic cell count on the gross composition , protein fractions and mineral content of individual ewe ' s milk. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 97, p. 16377–16381, 2012.

TEJADA, T. S. *et al.* Mastite subclínica por Staphylococcus coagulase negativa em ovinos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 64, p. 1074–1076, 2012.

VALLE, J. *et al.* Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 1323–1326, 1990.

VAZ, A. K. Mastite ovina. *A hora veterinária*, v. 93, p. 75–78, 1996.

VIANA, K. F. *et al.* Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 1, p. 59–63, 2010.

WELLNITZ, O. *et al.* Prediction of total quarter milk somatic cell counts based on foremilk sampling. *The Journal of dairy research*, v. 76, p. 326–330, 2009.

WICKSTRÖM, E. *et al.* Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v. 76, p. 195–201, 2009.