

Mastites ovinas: Epidemiologia, factores de virulência e antigénios imunorrelevantes de agentes etiológicos



Maria Cristina Calhau Queiroga
Universidade de Évora

2007

**Mastites ovinas:
Epidemiologia, factores de virulência e antigénios
imunorrelevantes de agentes etiológicos**

Maria Cristina Calhau Queiroga



168 292

Orientadora: Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Évora
2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram na elaboração deste trabalho:

Aos alunos que ajudaram com a recolha de amostras;

Às estagiárias, Célia, Esmeralda e Paula, e às bolsieras, Tita, Marta, Paula e Sílvia que suportaram uma parte do exigente trabalho de laboratório;

À Guilhermina e à Esperança que, com o seu trabalho e desembaraço, permitiram fazer os impossíveis;

À Lina, ao Ricardo e ao Filipe que nunca me recusaram auxílio nos trabalhos mais difíceis;

À Professora Ivone e à Rosário que me facultaram o Laboratório de Sanidade Vegetal e amparo científico sempre que precisei;

À Professora Hermínia de Lencastre por ter cedido estirpes de *Staphylococci* e ao Professor Buvernich por ter oferecido a linha de células BME.

À Marina que me acudiu com os estudos estatísticos;

À Eduarda e ao Marinho a quem posso sempre pedir o que não se pede a mais ninguém e que me socorrem sempre;

Last but not least, à minha orientadora que com a sua inteligência rara, raciocínio supersónico e ainda disponibilidade ilimitada, apesar das inúmeras ocupações que tem, me aturou e me acompanhou até ao fim.

Agradeço ainda às Instituições que suportaram financeiramente o meu trabalho:

À Fundação Eugénio de Almeida que me concedeu uma Bolsa de Doutoramento.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, através dos Projectos de Investigação PBIC/C/AGR/2332/95, PRAXIS XXI 3/3.2/CA/1995/95 e SAPIENS nº 34842/99.

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos
Inês e Eduardo
que tiveram que aprender que não são o centro do Mundo.
Foi uma lição desagradável mas necessária para apreciar a vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo o estudo da prevalência de mastites ovinas em explorações do Alentejo e a identificação dos agentes etiológicos, seus factores de virulência e epitopos imunorrelevantes.

A prevalência de mastite clínica e subclínica foi 1,7% e 32,2%, respectivamente. O agente etiológico mais prevalente foi *Staphylococcus epidermidis* (N=115), tendo sido também identificados *Staphylococcus aureus* (N=27) e *Streptococcus agalactiae* (N=17).

A pesquisa de factores de virulência permitiu identificar os padrões de susceptibilidade (N=404) e as Concentrações Inibitórias Mínimas de princípios activos (N=130). De 109 isolados de *Staphylococcus epidermidis*; oito revelaram capacidade para produzir biofilme *in vitro*. Os isolados estudados aderiam e eram internalizados por células epiteliais mamárias (N=12). A pesquisa de cinco superantigénios resultou negativa (N=27).

Foram estudados os perfis proteicos de *Staphylococcus epidermidis*, tendo sido identificados os epitopos imunorrelevantes, reconhecidos por imunoglobulinas séricas e mamárias. Verificou-se uma resposta imunológica local específica nos animais infectados.

SUMMARY

OVINE MASTITIS: EPIDEMIOLOGY, VIRULENCE FACTORS AND IMMUNORELEVANT ANTIGENES OF AETIOLOGICAL MICROORGANISMS

The present work aimed at investigating the prevalence of ovine mastitis in farms from Aletenjo and the identification of causative microorganisms, their virulence factors and immunorelevant epitopes.

The prevalence of clinical and subclinical mastitis was 1.7% and 32.2%, respectively. The most prevalent aetiological agent was *Staphylococcus epidermidis* (N=115); *Staphylococcus aureus* (N=27) and *Streptococcus agalactiae* (N=17) were also identified.

The investigation of virulence factors allowed the identification of susceptibility patterns (N=404) and drug Minimal Inhibitory Concentrations (N=130). From 109 *Staphylococcus epidermidis* isolates; eight showed the ability to produce biofilm *in vitro*. The isolates studied adhered and were internalised by mammary epithelial cells (N=12). None of the five superantigens studied was detected (N=27).

The protein profile of *Staphylococcus epidermidis* was determined, and the immunorelevant epitopes, recognised by blood and milk immunoglobulins, were identified. It was possible to detect a specific local immune response in infected animals.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
DEDICATÓRIA.....	V
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	IX
ÍNDICE.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XVII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXI
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	5
1.2 – MASTITES EM OVELHAS.....	7
1.3 – AGENTES ETIOLÓGICOS.....	33
1.4 – FACTORES DE VIRULÊNCIA EM AGENTES CAUSADORES DE MASTITE.....	51
1.5 – MECANISMOS DE DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	69
1.6 – AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NO CONTROLO DE MASTITES.....	81
2 – RASTREIO DE MASTITES EM OVELHAS.....	95
2.1 – INTRODUÇÃO.....	95
2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
2.2.1 – População em estudo e amostragem.....	99
2.2.2 – Teste Californiano de Mastites.....	100
2.2.3 – Análises bacteriológicas.....	104
2.3 – RESULTADOS.....	107
2.3.1 – Prevalência de mastites.....	107
2.3.2 – Utilização do TCM como indicador de infecção intramamária bacteriana.....	112
2.3.3 – Microrganismos isolados.....	113
2.3.4 – Relação entre etiologia e intensidade da inflamação.....	118
2.4 – DISCUSSÃO.....	121

3 – ESTUDO DE SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS A AGENTES ANTIMICROBIANOS	137
3.1 – INTRODUÇÃO.....	137
3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	139
3.2.1 – Teste de sensibilidade aos antibióticos - método de difusão.....	139
3.2.2 – Determinação da concentração inibitória mínima - método de diluições	142
3.2.3 – Comparação do método de difusão com o método de diluições	142
3.3 – RESULTADOS	143
3.3.1 – Teste de sensibilidade aos antibióticos - método de difusão.....	143
3.3.2 – Determinação da concentração inibitória mínima – método de diluições.....	151
3.3.3 – Comparação do método de difusão com o método de diluições	152
3.4 – DISCUSSÃO.....	159
4 – PESQUISA DE FACTORES DE VIRULÊNCIA EM <i>Staphylococcus epidermidis</i>	173
4.1 – INTRODUÇÃO.....	173
4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	177
4.2.1 – Avaliação da capacidade para produção de biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i> . 177	
4.2.2 – Ensaio de adesão e de invasão de células do epitélio mamário	179
4.2.4 – Pesquisa de superantígenos	184
4.3 – RESULTADOS	187
4.3.1 – Avaliação da capacidade para produção de biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i> . 187	
4.3.2 – Ensaio de adesão e de invasão de células do epitélio mamário	191
4.3.4 – Pesquisa de superantígenos	194
4.4 – DISCUSSÃO.....	197
5 – ESTUDO DE PROTEÍNAS IMUNORRELEVANTES DE <i>Staphylococcus epidermidis</i> E REACÇÃO HUMORAL ESPECÍFICA EM OVELHAS INFECTADAS NATURALMENTE.....	205
5.1 – INTRODUÇÃO.....	205
5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	207
5.2.1 – Extração de proteínas	207
5.2.2 – Doseamento de proteínas	208
5.2.3 – Separação das proteínas por electroforese.....	208
5.2.4 – Transferência electroforética.....	209
5.2.5 – Preparação dos soros	210
5.2.6 – <i>Immunoblotting</i>	210
5.2.7 – Determinação do peso molecular das proteínas	212
5.3 – RESULTADOS	213
5.4 – DISCUSSÃO.....	217

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	223
6.1 – CONCLUSÕES.....	223
6.2 – PERSPECTIVAS	233
BIBLIOGRAFIA.....	235
ANEXOS.....	275
Anexo 1 –TABELAS ANEXAS.....	275
Anexo 2 – REAGENTES E MEIOS DE CULTURA	301

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Teste Californiano de mastites	101
Figura 2: Placas com cultura em agar vermelho do Congo	187
Figura 3: Microplaca com teste quantitativo.....	188
Figura 4: Perfil proteico de <i>Staph. epidermidis</i>	213
Figura 5: <i>Immunoblot</i> com soro de leite de ovelha mastítica para detecção de IgG	214
Figura 6: Proteínas de <i>Staph. epidermidis</i> reconhecidas por IgG no sangue	215
Figura 7: Proteínas de <i>Staph. epidermidis</i> reconhecidas por IgA no leite.....	215
Figura 8: Proteínas de <i>Staph. epidermidis</i> reconhecidas por IgG no leite	216
Figura 9: Modelo proposto	229

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Prevalência de MSC em efectivos ordenhados mecânica e manualmente	110
Gráfico 2: Relação entre a intensidade da reacção inflamatória e o microrganismo responsável	119
Gráfico 3: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	143
Gráfico 4: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus xylosus</i>	144
Gráfico 5: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus hyicus</i>	144
Gráfico 6: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus simulans</i>	145
Gráfico 7: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus chromogenes</i>	145
Gráfico 8: Susceptibilidade de outros SCN	146
Gráfico 9: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	146
Gráfico 10: Susceptibilidade de <i>Streptococcus agalactiae</i>	147
Gráfico 11: Susceptibilidade de outros cocos Gram + catalase –	148
Gráfico 12: Susceptibilidade de <i>Enterococcus spp.</i>	148
Gráfico 13: Susceptibilidade de bacilos Gram +	149
Gráfico 14: Susceptibilidade de bacilos Gram –	149
Gráfico 15: Correlação entre a CIM e TSA de penicilina para <i>Staph. epidermidis</i>	153
Gráfico 16: Correlação entre a CIM de oxacilina e TSA de cloxacilina para <i>Staph. epidermidis</i>	153
Gráfico 17: Correlação entre a CIM e TSA de gentamicina para <i>Staph. epidermidis</i>	154
Gráfico 18: Correlação entre a CIM de clindamicina e TSA de lincomicina para <i>Staph. epidermidis</i>	155
Gráfico 19: Correlação entre a CIM de tetraciclina e TSA de oxitetraciclina para <i>Staph. epidermidis</i>	155
Gráfico 20: Correlação entre a CIM e TSA de rifampicina para <i>Staph. epidermidis</i>	156
Gráfico 21: Comparação entre a CIM de sulfamidas+trimetoprim e TSA de sulfamidas e de trimetoprim para <i>Staph. epidermidis</i>	158
Gráfico 22: Teste quantitativo e respectivo fenótipo em CRA	189

Gráfico 23: Adesão de <i>Staphylococcus epidermidis</i> a células epiteliais mamárias (BME).....	192
Gráfico 24: Relação entre adesão a células BME e reacção ao TCM	193

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da mastite subclínica sobre a composição do leite	10
Tabela 2: Teor de imunoglobulinas no colostro e leite de ovelha	77
Tabela 3: Causas de insucesso da antibioterapia em mastites	87
Tabela 4: Prevalência de MSC em ovelhas	96
Tabela 5: Prevalência de MSC em diferentes raças de ovelhas.....	97
Tabela 6: Correspondência entre resultados do TCM e CCS.....	97
Tabela 7: Caracterização dos efectivos estudados.....	100
Tabela 8: Interpretação do TCM	102
Tabela 9: Determinação da sensibilidade e especificidade do TCM.....	104
Tabela 10: Bactérias isoladas em cultura pura	106
Tabela 11: Prevalência de mastite clínica nos efectivos estudados	107
Tabela 12: Prevalência de mastite subclínica a nível de exploração	108
Tabela 13: Prevalência de MSC nos 18 efectivos.....	109
Tabela 14: Efeito do tipo de ordenha na incidência de mastites	110
Tabela 15: Prevalência de MSC no efectivo 4	111
Tabela 16: Efeito da raça na incidência de mastites.....	112
Tabela 17: Relação entre os resultados do TCM e respectivas análises bacteriológicas.....	112
Tabela 18: Sensibilidade e susceptibilidade do TCM para diferentes <i>cut-off points</i>	113
Tabela 19: Bactérias isoladas de amostras de leite de animais com MC	114
Tabela 20: Bactérias isoladas em cultura mista de amostras de leite de animais com MC	114
Tabela 21: Bactérias isoladas de amostras de leite de animais com MSC.....	116
Tabela 22: Bactérias isoladas em cultura mista de amostras de leite de animais com MSC.....	117
Tabela 23: Relação entre o microrganismo isolado e tipo de mastite.....	118
Tabela 24: Grau de reacções inflamatórias causadas por SCN	134
Tabela 25: Bactérias submetidas ao teste de susceptibilidade a antibióticos.....	140
Tabela 26: Agentes antibacterianos utilizados neste estudo	141
Tabela 27: Valores de CIM para <i>Staph. epidermidis</i> e <i>Staph. aureus</i>	152

Tabela 28: Comparação entre os dois métodos de antibiograma para <i>Staph. epidermidis</i>	156
Tabela 29: Comparação entre os dois métodos de antibiograma para <i>Staph. aureus</i>	157
Tabela 30: Relação entre resultados do TCM e produção de biofilme	189
Tabela 31: Médias de quadrados mínimos para a produção de biofilme pelas colónias de diferente expressão fenotípica.....	190
Tabela 32: Médias de quadrados mínimos para a produção de zooglia pelas diferentes classes de TCM	190
Tabela 33: Adesão de <i>Staph. epidermidis</i> a epitélio mamário	191
Tabela 34: Efeitos da produção de biofilme e da intensidade da reacção inflamatória na capacidade de adesão	194
Tabela 35: Produção de superantigénios por <i>Staph. epidermidis</i>	195
Tabela 36: Resposta à proteína estafilocócica com 25 kDa	214

LISTA DE ABREVIATURAS

A. – <i>Arcanobacterium</i>	DNase – desoxirribonuclease
Ac – anticorpo	DO – densidade óptica
ADCC – <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> , citotoxicidade celular mediada por anticorpos	E – especificidade de um teste
AICC – <i>antibody-independent cell-mediated cytotoxicity</i> , citotoxicidade celular independente dos anticorpos	<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>
Ag – antigénio	ECMBP – <i>extracellular matrix binding proteins</i> , proteínas que se ligam à matriz extracelular
AMC – agar MacConkey	EDTA – ácido etileno-diamino-tetraacético
AS – agar sangue	<i>Enteroc.</i> – <i>Enterococcus</i>
ATCC – American Type Culture Collection	Fc – fragmento cristalizável das imunoglobulinas
AW – agar Wilkins Chalgren	GALT – <i>gut associated lymphoid tissue</i> , tecido linfático associado ao intestino
BALT – <i>bronchial associated lymphoid tissue</i> , tecido linfático associado aos brônquios	GCP-2 – <i>granulocyte chemotactic protein-2</i> , proteína quimiotáctica para os granulócitos-2
Bap – <i>biofilm associated protein</i> , proteína associada ao biofilme	G-CSF – <i>granulocyte- colony stimulating factor</i> , factor de estimulação de colónias de granulócitos
BHIB – <i>brain heart infusion broth</i>	GM-CSF – <i>granulocyte- macrophage- colony stimulating factor</i> , factor de estimulação de colónias de granulócitos e de macrófagos
BME – (linha celular) <i>bovine mammary epithelium</i> , epitélio mamário de bovino	IFN – interferão
C. – <i>Corynebacterium</i>	Ig – imunoglobulina
CCS – contagem de células somáticas	IL – interleuquina
CD – <i>cluster of differentiation</i> (marcador celular)	Kb – kilobase
CIM – concentração inibitória mínima	kDa – quilodalton
CIM ₅₀ – CIM para 50% dos isolados	LBP – <i>LPS-binding protein</i>
CIM ₉₀ – CIM para 90% dos isolados	LPS – lipopolissacarídeo
CRA – agar vermelho do Congo	MALT – <i>mucosal associated lymphoid tissue</i> , tecido linfático associado às mucosas
DAB – 3,3'-diaminobenzidina	MC – mastite clínica
DHF – (ácido) di-hidro-fólico	MHC – <i>major histocompatibility complex</i> , complexo maior de histocompatibilidade
DNA – ácido desoxirribonucleico	

MRSA – *methicillin resistant Staph. aureus*

MSC – mastite subclínica

MSCRAMM – *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz extracelular

NAGase – N-acetil- β -D-glucosaminidase

NET – *neutrophil extracellular trap*, armadilha extracelular de neutrófilos

NK – (célula) *natural killer*, assassina natural

NMC – National Mastitis Council

NRCNS – *novobiocin resistant coagulase negative Staphylococci*, estafilococos coagulase negativos resistentes à novobiocina

NSCNS – *novobiocin sensitive coagulase negative Staphylococci*, estafilococos coagulase negativos sensíveis à novobiocina

PABA – (ácido) para-amino-benzoico

PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforese em gel de poliácridamida

PAMP - *pathogen-associated molecular patterns*, padrão molecular associado a agentes patogénicos

Past. – *Pasteurella*

PBP 2a – *penicillin-binding protein 2a*

PBS – *phosphate buffer saline*, tampão fosfato

PCA – *plate count agar*

PIA – *polysaccharid intercellular adhesin*, adesina intercelular polissacarídica

PMN – polimorfonuclear neutrófilo

PRR – *pattern recognition receptor*, receptor que reconhece um padrão

PSA – *capsular polysaccharid adhesin*, adesina capsular polissacarídica

Pseud. – *Pseudomonas*

PTSAg – *pyrogenic toxin superantigen*, toxina pirogénica superantigénio (=SAg – superantigénio)

rh – recombinante humano

RNA – ácido ribonucleico

ROI – radicais livres de oxigénio (iões tóxicos)

S – sensibilidade de um teste

SALT – *skin associated linfoid tissue*, tecido linfático associado à pele

SCN – *Staphylococcus coagulase negativo*

SDS – dodecil-sulfato de sódio

SE – *staphylococcal enterotoxin*, enterotoxina estafilocócica

Staph. – *Staphylococcus*

Strep. – *Streptococcus*

SUAM – *Streptococcus uberis adhesion molecule*

Tc – T citotóxico (linfócito)

TCM – teste californiano de mastites

Th – T *helper* (linfócito)

THF – (ácido) tetra-hidro-fólico

TLR – *Toll-like receptor*

TNF – *tumor necrosis factor*, factor de necrose de tumores

TSA – teste de sensibilidade aos antibióticos

TSB – *tryptone soya broth*

TSST – *toxic shock syndrome toxin*, toxina do síndrome do choque tóxico

UFC – unidade formadora de colónia

V – vestigial ou suspeito (reacção ao TCM)

VPn – valor predictivo de um teste com resultado negativo

VPp – valor predictivo de um teste com resultado positivo

1 – INTRODUÇÃO

A produção de leite de ovelha, para o fabrico de queijos tradicionais, tem vindo a assumir uma importância relevante como recurso económico, face à crise que atinge o sector agrícola em Portugal. Porém, os problemas infecciosos da glândula mamária nos ovinos conduzem a prejuízos económicos elevados, resultantes de diversas causas. A mastite clínica muitas vezes leva à morte do animal, e, quando tal não se verifica, conduz com frequência ao seu refugo precoce visto a função da glândula não ser inteiramente restabelecida (Jones, 1991). Além disso, frequentemente os borregos não sobrevivem e as despesas em medicamentos e cuidados veterinários são elevadas (Fthenakis e Jones, 1990a). A mastite subclínica, por outro lado, é responsável por diminuição na produção de leite (Dario *et al.*, 1996; Gonzalo *et al.*, 2002) e redução do rendimento em queijo (Rossi *et al.*, 1994; Silanikove *et al.*, 2005), o qual resulta de inferior qualidade (Wendorff, 2002). O consumo de leite ou seus derivados, proveniente de animais com este tipo de afecção, pode, ainda, representar eventuais riscos para a saúde pública, por conter toxinas responsáveis por toxinfecções alimentares (Smiko, 1993; De Buyser *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores referem a possibilidade de a mastite subclínica nas ovelhas poder evoluir para a forma clínica (Watkins *et al.*, 1991), não sendo, no entanto, esta convicção consensual (Bor *et al.*, 1989).

Em situações de mastite aguda e hiper-aguda, o animal está sujeito a desconforto, contrariando as orientações europeias que determinam ser necessário assegurar que os animais não sejam sujeitos a dores ou sofrimento evitáveis. Os proprietários ou detentores de animais são obrigados a respeitar exigências mínimas de bem-estar (Comunidades Europeias, 2005).

Actualmente, o tratamento e profilaxia da mastite dependem da utilização de agentes antimicrobianos. No entanto, vários factores condicionam a eficácia destes medicamentos, nomeadamente aspectos de farmacocinética e farmacodinâmica (Sandholm *et al.*, 1990). Além disso, a utilização de antibióticos exerce uma pressão de selecção que leva à emergência de estirpes resistentes e

multi-resistentes (Costa, 2005; Rajala-Schultz *et al.*, 2005), as quais não só agravam o problema do tratamento das mastites, como ainda constituem um perigo para a saúde pública. A este aspecto, acresce o papel dos resíduos antibióticos eliminados no leite dos animais durante e após o tratamento, se não forem cumpridos os intervalos de segurança, que podem também exercer pressão de selecção sobre bactérias resistentes a antibióticos (Piddock, 1996). Existem várias evidências de que a utilização de determinado antibiótico para o tratamento de animais, incluindo vacas leiteiras, origina surtos de infecções com microrganismos resistentes em humanos (Angulo *et al.*, 2004; Tollefson e Karp, 2004).

A incidência e etiologia das mastites têm sido exaustivamente investigadas em bovinos, mas este aspecto tem sido algo negligenciado em patologia ovina. Em Portugal, particularmente no Alentejo, região de produtividade agro-pecuária condicionada por condições edafoclimáticas particulares, a utilização de leite de ovelha para o fabrico de queijo tradicional representa uma mais-valia importante. Porém não existem estudos que indiquem qual a situação da mastite ovina no nosso País.

O queijo produzido na região de Évora (Sudeste de Portugal), designado comercialmente por queijo de Évora, é um queijo curado de pasta dura ou semi-dura, fabricado com leite cru de ovelha, segundo técnicas artesanais (Potes, 2000). Como a mastite subclínica não é facilmente detectada, o leite de ovelhas com mastite pode ser adicionado ao leite de ovelhas saudáveis. Este leite de qualidade questionável é, assim, utilizado na produção de queijo, prejudicando o rendimento em queijo e podendo até constituir risco para o consumidor.

Existem poucos estudos sobre a susceptibilidade a agentes antimicrobianos de microrganismos causadores de mastite ovina. Por esta razão, a utilização indiscriminada de antibióticos no tratamento desta enfermidade pode ser um factor importante para a selecção de estirpes resistentes, prejudicando a saúde animal e a saúde pública.

O estudo da mastite ovina assume especial importância no Alentejo. O conhecimento da situação da mastite ovina na nossa região é fundamental para

se poderem instituir medidas de controlo eficientes que contribuam para diminuir a prevalência desta patologia nos efectivos ovinos, melhorando a qualidade do leite produzido e, assim, beneficiar o respectivo rendimento em queijo e assegurar segurança alimentar do produto.

É igualmente importante conhecer a etiologia e susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos microrganismos mais frequentemente isolados, para possibilitar o uso prudente de antibióticos.

O estudo de terapêuticas alternativas ao uso de antibióticos é particularmente urgente para reduzir a sua utilização, tal como é preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). É necessário conhecer em profundidade o poder patogénico dos agentes etiológicos de mastite ovina e compreender os mecanismos da reacção imunológica que se estabelecem face à infecção intramamária, para investir em métodos profiláticos e terapêuticos com base na estimulação das defesas naturais do animal. Neste contexto, poderá ser útil o estudo de epitopos em agentes patogénicos com particular relevância para a patologia da glândula mamária ovina, com o objectivo de identificar antigénios vacinais que possam ser utilizados para o controlo de mastites em ovelhas.

1.1 – OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo geral deste trabalho foi averiguar a prevalência e etiologia de mastites ovinas em explorações da região de Évora, detectar factores de virulência expressos pelos microrganismos mais relevantes e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de defesa da glândula mamária nos ovinos. Estes conhecimentos poderão contribuir para equacionar novas medidas de prevenção e tratamento de mastites, com base em métodos imunológicos.

Assim, foi realizado um estudo que incidiu sobre 18 efectivos de ovelhas exploradas para a produção de leite, cujos objectivos específicos foram:

1. Determinar a prevalência de mastite clínica e de mastite subclínica nestes efectivos;
2. Pesquisar a etiologia de mastite nas ovelhas;
3. Averiguar a susceptibilidade dos microrganismos isolados aos agentes antimicrobianos.

Relativamente ao agente etiológico mais frequentemente isolado, o estudo visou ainda:

4. Estudar factores de virulência;
5. Identificar proteínas imunorrelevantes e investigar a respectiva resposta imunológica local e geral em ovelhas infectadas naturalmente.

1.2 – MASTITES EM OVELHAS

Definição

O termo mastite provém do grego *mastós*, que significa seio, e *ite*, sufixo que significa inflamação (Costa e Melo, 1999), é sinónimo de mamite, originário do latim *mamma* e *ite*, e significa inflamação do parênquima da glândula mamária, independentemente da causa. Esta afecção caracteriza-se por alterações físicas e químicas do leite e alterações patológicas do tecido mamário (Radostits *et al.*, 2000).

A doença pode apresentar-se sobre a forma clínica – mastite clínica (MC) –, se houver manifestações evidentes no úbere e/ou no leite, as quais podem assumir diferentes estados de severidade, ou subclínica – mastite subclínica (MSC) – se não existirem quaisquer sinais clínicos de inflamação nem alteração do aspecto normal do leite.

Etiologia

O processo inflamatório da glândula mamária pode ser ocasionado por um traumatismo ou, raramente, por uma alergia ou neoplasia (Menzies e Ramannoon, 2001) mas, geralmente, é resultante de uma infecção por microrganismos, mais frequentemente bactérias. Diferentes microrganismos podem actuar como agentes etiológicos de mastites tendo, nos bovinos, sido já identificados cerca de 140 espécies microbianas diferentes. Não existem tantos estudos disponíveis relativamente à etiologia da mastite ovina, mas é já conhecida uma gama relativamente alargada de microrganismos capaz de provocar mastite nesta espécie, conforme será aprofundado no Capítulo 1.3.

Tradicionalmente, a mastite é considerada contagiosa, quando a fonte de infecção é a glândula mamária infectada de outro animal, sendo designada por mastite ambiental se a fonte de infecção for o meio ambiente (Radostits *et al.*, 2000).

No Capítulo 1.3 é apresentado em detalhe o conhecimento actual sobre a etiologia da mastite nos ovinos.

Epidemiologia

A mastite ovina é um processo de distribuição mundial; porém, assume maior importância nos países do Sul da Europa, onde as ovelhas são exploradas para a produção de leite. A mastite em ovelhas assim exploradas é mais comum do que em ovelhas utilizadas para a produção de borregos, que não são ordenhadas, facto mencionado já no século XIX por Nocard (1887, citado por Colditz e Watson, 1985).

Nas ovelhas, a mastite clínica ocorre geralmente no período peri-parto ou, mais frequentemente, logo após o desmame (Jones, 1991; Radostits *et al.*, 2000). A sua prevalência em ovelhas em pastoreio, geralmente, não ultrapassa os 2% por ano (Radostits *et al.*, 2000) podendo, no entanto, ser superior em ovelhas estabuladas, principalmente devido a traumatismos. Jones (1991) refere incidências anuais com valores entre 0 e 24%, com uma média de 5% para mastites agudas e 8,4 % para mastites crónicas. Apesar da baixa prevalência, a mastite clínica pode ser responsável por 10% de mortes nas ovelhas.

Os valores apresentados para a prevalência de mastite subclínica em ovelhas, baseados em resultados de rastreios realizados em diferentes países são muito divergentes, situando-se entre 9% e 83% de ovelhas afectadas (Bor *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990; Jones, 1991; Watkins *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1992a; Dario *et al.*, 1993; Tietze *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; Stefanakis *et al.*, 1995; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Las Heras *et al.*, 1999a; Pengov, 2001).

As causas determinantes das mastites são, como referimos, microrganismos, mais frequentemente bactérias. No entanto, existem causas predisponentes que, ao alterar o equilíbrio normalmente existente entre o animal, o ambiente e os microrganismos, vão permitir o desencadeamento do processo infeccioso. Como tal, a mastite é vulgarmente referenciada como uma doença multifactorial, dada a diversidade de aspectos que podem influenciar a sua prevalência e incidência nos

efectivos. Os factores de risco, ou as suas causas predisponentes, podem ter origem no animal, no ambiente ou ser inerentes ao próprio agente etiológico.

De entre os factores de risco com origem no animal, destacam-se a raça, a idade e a resistência genética individual. Esta pode incluir factores morfológicos, factores fisiológicos ou imunológicos. São ainda relevantes, o estado de nutrição, a fase da lactação, a coexistência de outras doenças ou a existência de traumatismos.

Os factores de risco de origem ambiental e de manejo incluem a qualidade e manejo das instalações, a qualidade da ordenha, que por sua vez depende do pessoal encarregue de a executar, do equipamento de ordenha utilizado e do cumprimento das regras de higiene preconizadas.

Os factores de risco com origem no agente patogénico incluem a capacidade de sobrevivência do microrganismo no meio ambiente, a sua resistência aos produtos desinfectantes utilizados na exploração, para além da expressão de factores de virulência como a capacidade de colonização e a produção de toxinas.

As causas predisponentes, duma forma geral, actuam diminuindo as resistências do animal e/ou aumentando as possibilidades de acesso dos microrganismos à glândula mamária. Estas causas podem ser controladas e minimizadas através de um manejo adequado.

Quanto aos prejuízos económicos, à semelhança do que acontece nas explorações de bovinos leiteiros, os processos mastíticos nos ovinos são responsáveis por quebras de produção e refugo precoce de animais (Jones, 1991). Estes prejuízos podem ascender a perdas anuais de cerca de 10% (Nocard em 1887, citado por Colditz e Watson, 1985; Radostits *et al.*, 2000).

A produção de leite em ovelhas com mastite subclínica pode estar diminuída em 8,8-10% no caso de animais só com uma das glândulas afectadas. Se a afecção se estender às duas metades mamárias, a quebra de produção pode atingir valores mais elevados, variando entre 10% e 32% (Dario *et al.*, 1996; Gonzalo *et al.*, 2002), podendo mesmo ultrapassar os 50% (Silanikove *et al.*, 2005). Estudos experimentais confirmam a diminuição da produção devido a MSC (Fthenakis e

Jones, 1990a; 1990b; Winter *et al.*, 2003), por redução da capacidade secretora do epitélio mamário, tal como foi demonstrado através da observação de alterações histológicas (Fthenakis e Jones, 1990a).

Vários autores referem a influência negativa das mastites subclínicas sobre o crescimento e sobrevivência dos borregos (Fthenakis e Jones, 1990a; Jones, 1991; Larsgard e Vaabenoe, 1993); no entanto, este aspecto pode ser minimizado se os borregos tiverem acesso a alimentação suplementar (Keisler *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 1992a).

O leite proveniente de animais com mastite apresenta alterações químicas e microbiológicas que podem interferir negativamente nos processos tecnológicos de transformação do leite. O efeito da mastite subclínica sobre a composição do leite está sumariado na Tabela 1.

Tabela 1: Efeito da mastite subclínica sobre a composição do leite

(adaptado de Philpot, 1984)

Composto	Aumentado	Diminuído
Lactose		5 a 20%
Proteínas totais		ligeiramente
Caseína		6 a 18%
Imunoglobulinas	X	
Sólidos não gordos		até 8%
Sólidos totais		3 a 12%
Gordura		5 a 12%
Lipase	X	
Sódio	X	
Cloro	X	
Fósforo		X
Potássio		X
Termo-estabilidade		X

A diminuição dos teores de lactose, caseína, sólidos e gordura no leite mastítico vão prejudicar a sua rentabilidade queijeira, além de determinar um aumento do tempo de coagulação, por acção do coalho, e produzir uma coalhada de tensão inferior à produzida a partir de um leite normal (Schalm *et al.*, 1971; Philpot, 1984; Vitkov *et al.*, 1989; Rossi *et al.*, 1994; Leitner *et al.*, 2004; Quintana e Martín,

2005; Silanikove *et al.*, 2005). Além disso, o queijo produzido com leite mastítico apresenta níveis de rancidez superiores ao habitual (Wendorff, 2002).

No que diz respeito a alterações microbiológicas, é de particular importância o facto de o leite mastítico favorecer o crescimento de certos microrganismos patogénicos – *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* – em detrimento dos lactobacilos (Fang *et al.*, 1993). Este aspecto, além de poder afectar o rendimento em queijo, pode ter repercussões ao nível da saúde pública.

Relativamente ao potencial zoonótico desta doença, é importante salientar que foram já isoladas de leite mastítico de ovino estirpes de *Staph. aureus* produtoras de enterotoxinas e toxina responsável pelo síndrome do choque tóxico (*toxic shock syndrome toxin*, TSST-1) (Orden *et al.*, 1992a; b), sendo as estirpes de origem ovina mais toxinogénicas do que as isoladas de leite de bovino ou de caprino. As toxinas referidas podem também ser produzidas por espécies de *Staphylococci* coagulase negativos (SCN), como *Staph. xylosus* e *Staph. epidermidis* isolados a partir do leite de ovelhas com mastite (Orden *et al.*, 1992a; c). Existem referências a surtos de toxinfecções alimentares devido ao consumo de queijo de ovelha elaborado com leite cru, tendo sido identificadas enterotoxinas estafilocócicas no queijo (De Buyser *et al.*, 2001).

No fabrico de queijos artesanais, produzidos com leite de ovelha, em várias regiões de Portugal, incluindo o Alentejo, é geralmente utilizado leite de ovelha cru (Potes, 2000). Como a mastite subclínica, geralmente, não é detectada, o leite mastítico, com todas as características nocivas acima referidas, é utilizado na produção desses queijos. Portanto, além dos prejuízos económicos resultantes do baixo rendimento queijeiro, a utilização de leite mastítico pode constituir um risco para o consumidor.

Patogenia

Radostits e colaboradores (2000) descrevem o processo infeccioso da mastite, dividindo os mecanismos de infecção em três fases. Na primeira fase, que os autores designam por fase de invasão, os microrganismos atingem a glândula mamária. Apesar de, muito raramente, a invasão poder ocorrer por via endógena, como por exemplo durante um processo de linfadenite caseosa, geralmente os

microrganismos penetram na glândula mamária através do canal do teto. Como tal, esta fase está na estreita dependência de factores de manejo e higiene.

Na segunda fase, a de colonização, os microrganismos fixam-se às células mamárias, multiplicam-se e estendem-se aos tecidos adjacentes, embora alguns microrganismos possam desenvolver-se na glândula mamária sem aderir às células (Anderson, 1978). Podem interferir com o desenvolvimento desta fase factores inerentes à espécie bacteriana, nomeadamente, a sua capacidade para aderir ao epitélio mamário e aptidão para crescer no leite, a presença de substâncias protectoras no leite, anticorpos ou leucócitos, e a própria fase da lactação, de que depende o efeito mecânico de arraste do leite.

A terceira e última fase corresponde à reacção do hospedeiro, iniciada por uma reacção inflamatória. É nesta fase que surgem os sintomas, no caso da mastite clínica, e o aumento da contagem de células somáticas, na mastite subclínica. O desenvolvimento desta etapa é influenciado por factores de virulência da bactéria, particularmente a capacidade invasora e de toxigénese, e a susceptibilidade da glândula mamária, nomeadamente a presença de imunoglobulinas e a libertação de mediadores inflamatórios.

A presença das bactérias estimula a produção e libertação de mediadores inflamatórios pelos macrófagos normalmente presentes na glândula mamária e pelas próprias células do epitélio mamário, conforme tem sido referido por vários investigadores nos últimos anos (Vilela, 1993; Barber *et al.*, 1999; Lahouassa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Estes mensageiros químicos, juntamente com detritos celulares, são quimiotácticos para os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs). Durante este processo, as células endoteliais dos vasos sanguíneos próximos expressam moléculas de adesão, as quais reconhecem ligandos expressos à superfície dos PMNs, que são marginalizados e aderem ao endotélio vascular. Por fim, os neutrófilos atravessam a parede dos vasos por diapedese e, passando entre as células alveolares, atingem o lume dos alvéolos.

O microrganismo envolvido no processo infeccioso determina o tipo e a intensidade da produção de factores inflamatórios e quimiotácticos pela glândula mamária; estes condicionam a acumulação de PMNs e, conseqüentemente a

evolução do estado clínico da mastite. A infecção por *Escherichia coli*, comparativamente com a infecção devido a *Staph. aureus*, induz maior produção de factor C5a do complemento e de citocinas, maior acumulação de PMNs e sintomatologia clínica exuberante, a qual evolui para a cura. Ao contrário, na infecção resultante de *Staph. aureus* há fraca indução de factores quimiotácticos, baixa acumulação de PMNs e, geralmente, a forma de mastite é subclínica e evolui para a cronicidade (Riollet *et al.*, 2000; Bannerman *et al.*, 2004). A infecção intramamária por *Pseudomonas aeruginosa* produz uma reacção intensa, com indução de citocinas pró-inflamatórias, activação do complemento e elevação de moléculas envolvidas no reconhecimento de bactérias Gram-negativas (Bannermann *et al.*, 2005). Vilela (1993), num estudo *in vitro* realizado em células mamárias de ovelha, verificou que extractos bacterianos, obtidos de isolados clínicos de *Mannheimia haemolytica*, induzem a expressão de um padrão de genes codificantes de citocinas diferente do induzido por LPS de *E. coli*. Esta diferença poderá contribuir para a evolução clínica da infecção.

Além dos aspectos referidos, a evolução clínica da mastite depende também do próprio animal. A infecção experimental da glândula mamária em 5 ovelhas, com *Staph. epidermidis*, resultou numa resposta inflamatória variável, em que a produção de diferentes teores de mediadores inflamatórios nos diversos animais resultou em diferentes desenvolvimentos do processo infeccioso (Winter *et al.*, 2002; 2003; 2005).

O número de neutrófilos recrutados e o tempo que demoram a chegar ao local de infecção são determinantes para a evolução da mastite (Oviedo-Boyso *et al.*, 2006; Rainard e Riollet, 2006). A severidade e duração da mastite dependem da rapidez de migração dos leucócitos e da sua actividade bactericida no local da infecção. Se o agente infeccioso conseguir evadir-se às defesas do hospedeiro, a inflamação persiste, e prossegue a migração de leucócitos por entre as células secretoras para o lume dos alvéolos. Esta leucodiapedese prolongada provoca a destruição do tecido mamário, que é agravada pelas toxinas produzidas pelas bactérias, pelos mediadores inflamatórios (Radostits *et al.*, 2000) e pelos radicais livres de oxigénio produzidos pelos PMNs. Estes radicais, sendo benéficos quando intracelulares, pois contribuem para a lise das bactérias fagocitadas, são,

pelo contrário, capazes de danificar as células epiteliais, quando extracelulares (Mehrzad *et al.*, 2005).

A função dos neutrófilos no leite é fagocitar e destruir as bactérias invasoras (Paape *et al.*, 2000). Em comparação com os neutrófilos sanguíneos, estas células são menos eficientes, o que se deve ao facto de fagocitarem glóbulos de gordura e caseína (Berthon e Salmon, 1993). A sua actividade fagocitária parece estar diminuída em ovelhas com infecção intramamária relativamente a animais não infectados (Moroni e Cuccuru, 2001). Apesar destes condicionantes, as células fagocitárias são consideradas a principal defesa da glândula mamária (Harmon, 1994; Burton e Erskine, 2003).

Após a eliminação dos agentes patogénicos, o influxo de neutrófilos cessa e é seguido por um influxo de macrófagos, que vão participar na remoção daquelas células. A rápida eliminação dos neutrófilos é fundamental para minimizar os danos provocados pela inflamação sobre as células secretoras mamárias (Rainard e Riollot, 2006).

A destruição das células epiteliais e a presença de mediadores pró-inflamatórios aumentam a permeabilidade da barreira entre o leite e os fluidos intersticiais e, portanto, constituintes do soro sanguíneo, como a seroalbumina, atingem o leite. A exsudação do plasma transporta para o local de infecção factores solúveis importantes para combater os microrganismos responsáveis, designadamente imunoglobulinas e componentes do complemento (Rainard e Riollot, 2006).

A destruição do tecido secretor resulta na diminuição da capacidade secretora da glândula mamária e, conseqüentemente, na diminuição da produção de leite. Além deste, outros mecanismos contribuem para a quebra de produção de leite. Durante o processo mastítico, a pressão osmótica é alterada, originando uma modificação do pH intracelular, que, por sua vez, vai provocar uma diminuição da actividade enzimática nas células mamárias. Também há uma redução do fluxo sanguíneo capilar, com conseqüente diminuição do suprimento de precursores do leite, nomeadamente, glucose, ácidos gordos e aminoácidos. Ainda, o edema gerado pela reacção inflamatória provoca uma diminuição do diâmetro do lume dos canais galactóforos, por compressão, aumentando a pressão do leite, levando

à diminuição da produção por parte do epitélio secretor, através de reflexo neuro-endócrino (Radostits *et al.*, 2000).

Durante um processo de mastite, podem formar-se coágulos resultantes da agregação dos leucócitos e factores de coagulação que bloqueiam os pequenos canais secretores, impedindo a passagem do leite. A destruição das células epiteliais, associada a este processo, pode resultar na formação de tecido fibroso, com perda permanente de função na respectiva fracção da glândula mamária.

Sintomatologia

A infecção da glândula mamária designa-se por mastite clínica quando é possível diagnosticar uma mastite através da sintomatologia evidenciada. Na forma clínica, o úbere apresenta os sinais clássicos de inflamação, tumor, calor, rubor e dor, os quais, conforme a sua exuberância, distinguem as formas de mastite hiperaguda, mastite aguda e mastite crónica. Alterações evidentes do aspecto característico do leite podem acompanhar a sintomatologia ao nível do úbere ou constituir o único indicador clínico de mastite. O leite pode apresentar-se com a viscosidade diminuída ou elevada, até atingir um aspecto purulento, pode estar floculado ou com coágulos, a sua cor pode parecer alterada e o cheiro pode ser desagradável.

Na mastite aguda, os sinais inflamatórios são evidentes, o úbere está aumentado de volume, avermelhado, nota-se aumento da temperatura local e dor à palpação, frequentemente o animal claudica do membro correspondente à metade mamária afectada e, por vezes, é possível verificar a presença de abscessos. O leite está mais ou menos alterado, até à completa supressão da secreção láctea. A mastite designa-se por hiperaguda quando, aliado a este quadro sintomático, há alteração do estado geral do animal, com depressão, febre, que pode ser seguida por hipotermia, desidratação e/ou anorexia. Nas ovelhas, é frequente o decurso da mastite levar à gangrena da glândula mamária; a pele do úbere adquire uma coloração vermelha a azulada, que se pode estender à região abdominal, e o úbere apresenta-se frio à palpação. Esta condição geralmente evolui para a morte do animal, mas se o animal sobrevive, a glândula gangrenada e tecidos

adjacentes destacam-se e a ferida resultante cicatriza por segunda intenção (Menzies e Ramannon, 2001).

A mastite crónica surge geralmente como resultado de uma mastite aguda em que se verificou cura clínica mas não microbiológica (Jones, 1991). Neste caso, o leite está apenas ligeiramente alterado e os sinais inflamatórios são recorrentes e pouco evidentes. À palpação, a metade afectada apresenta alterações na consistência glandular que está dura e fibrótica. A glândula pode apresentar múltiplos abscessos, nódulos ou estar atrofiada. Esta forma de mastite pode prolongar-se no tempo, ao contrário da mastite aguda e hiperaguda, que são de evolução rápida.

Em situações em que só uma pequena extensão da glândula mamária está afectada, não há sintomas inflamatórios evidentes ao nível do úbere, nem o leite manifesta alterações detectáveis através do exame clínico. Neste caso a mastite designa-se por mastite subclínica. O diagnóstico deste tipo de mastite está dependente do exame do leite para detectar o aumento da quantidade de células somáticas, as alterações químicas ou a presença de microrganismos responsáveis pela infecção da glândula mamária. Também é possível detectar a mastite subclínica através de controlo individual de produção, observando-se quebras de produção de leite nos animais afectados.

No leite normal existem células vulgarmente designadas por células somáticas. Estas células incluem neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e células epiteliais, resultantes da descamação fisiológica do epitélio mamário. Nas ovelhas, as células epiteliais no leite representam menos de 3% das células somáticas. No leite de animais saudáveis, os macrófagos são as células predominantes (Outteridge e Lee, 1988). No decurso de um processo mastítico, o número de células presentes no leite aumenta, devido à afluência de células inflamatórias e à destruição das células do epitélio mamário. Os neutrófilos passam a ser as células mais representativas, constituindo mais de 90% do total de leucócitos na glândula mamária durante a inflamação. A detecção da quantidade de células somáticas por mililitro de leite, contagem de células somáticas (CCS) é, portanto, um dos indicadores da existência de mastite

subclínica, sendo considerada a principal medida do estado sanitário do úbere e de qualidade do leite (Radostits *et al.*, 2000).

Diagnóstico

O diagnóstico de mastite clínica é feito com base na observação de alterações clínicas, nomeadamente alterações inflamatórias do úbere, e/ou alteração do aspecto característico do leite, que podem ou não ser acompanhadas por sinais sistémicos de infecção.

O diagnóstico de mastite subclínica só é possível através de exames do leite para detectar as alterações não evidentes. Como foi referido, a avaliação das descargas celulares é a principal medida utilizada. Esta pode ser executada directamente através de preparações microscópicas de leite coradas pelo método de Breed e Brew ou recorrendo a contadores electrónicos que quantificam as células depois de corado o seu DNA com brometo de etídio ou que enumeram partículas de acordo com o seu volume. A avaliação da descarga celular no leite pode ainda ser realizada através de métodos indirectos, indicadores do nível de células no leite. Estes métodos detectam a presença, no leite, de constituintes celulares como o DNA, proteínas plasmáticas ou enzimas. A estimativa da quantidade de DNA no leite constitui o princípio do teste californiano de mastites (TCM), que é o método de diagnóstico expedito de mastite mais utilizado (van Werven *et al.*, 2005), enquanto a prova de Whiteside se baseia na apreciação do nível de proteínas plasmáticas presentes no leite. Como enzimas de origem celular, indicadoras da presença de células somáticas no leite, destacam-se a lacto-desidrogenase e a catalase. O nível de polimorfonucleares no leite pode ainda ser avaliado através de um teste de ELISA, que detecta a presença de antígenos específicos destas células. A pesquisa do enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase), proveniente dos lisosomas, é indicador de destruição tecidular, visto que este enzima tem origem primordialmente nas células do epitélio mamário (Kitchen *et al.*, 1978). No entanto, o seu doseamento está directamente correlacionado com a CCS (Radostits *et al.*, 2000).

Relativamente aos ovinos, não foi ainda determinado um limite universal para o número de células somáticas no leite a partir do qual se considera que há MSC

(Radostits *et al.*, 2000). Diversos autores sugerem diferentes limites, desde 250×10^3 células/mL de leite (De La Cruz *et al.*, 1994; Pengov, 2001), 300×10^3 células/mL (González-Rodríguez *et al.*, 1995), 400×10^3 células/mL (Leitner *et al.*, 2000), 500×10^3 células/mL (Travnicek *et al.*, 1978; Vitkov e Vitanov, 1980 referidos por Fthenakis *et al.*, 1991; Berthelot *et al.*, 2006), $1\ 000 \times 10^3$ células/mL (Jones, 1991; Fthenakis *et al.*, 1991), até $1\ 500 \times 10^3$ células/mL de leite (Mavrogenis *et al.*, 1995). Segundo Radostits *et al.* (2000), a CCS em ovelhas saudáveis pode variar entre 500×10^3 e $1\ 000 \times 10^3$ células/mL. No entanto, mais de 95% das amostras de leite destas ovelhas revelou valores abaixo de 500×10^3 células/mL. Num estudo que integrou 357 ovelhas, pertencentes a 8 efectivos, a CCS dos animais sem infecção intramamária variou entre os valores 255 e 320×10^3 células/mL de leite (Bergonier *et al.*, 2005b). Porém, os resultados de um estudo que incidiu sobre 5 672 ovelhas revelaram que o leite de ovelhas livres de infecção intramamária contém menos de 250×10^3 células/mL (Romeo *et al.*, 1998). Paape e colaboradores (2001) referem que a CCS em ovelhas não infectadas é semelhante à contagem em vacas nas mesmas condições, podendo variar entre 10 e 200×10^3 células/mL. O facto de diferentes raças de ovelhas, no seu estado hígido, revelarem diferentes CCS sugere a necessidade de usar limites especificamente definidos para cada raça (González-Rodríguez *et al.*, 1995; Las Heras *et al.*, 1999a). Nos Estados Unidos da América, o limite legal para a CCS no leite de ovelha, leite de conjunto do tanque, é 750×10^3 /mL (Paape *et al.*, 2001). Berthelot e colaboradores (2006) referem que uma CCS no leite do tanque de 650×10^3 é indicadora de 15% de prevalência de mastite no efectivo, sendo a contagem de 100×10^3 indicativa de uma prevalência de 2 a 3%.

Além do agravamento do teor de células somáticas, a mastite determina outras alterações no leite, cuja detecção permite o diagnóstico de MSC. O facto de a permeabilidade dos vasos estar aumentada durante um processo mastítico permite a passagem de iões para o leite. Enquanto o aumento de iões de sódio e cloro são responsáveis por um acréscimo da condutividade do leite, os iões de bicarbonato determinam uma elevação do seu pH. A destruição do epitélio alveolar possibilita o acesso ao leite de soro sanguíneo, o que lhe confere actividade anti-tripsínica, aumentando, também a concentração de seroalbumina.

A constatação destas alterações químicas no leite é, portanto, indicativa da existência de MSC.

Pode também diagnosticar-se a mastite subclínica através de análises microbiológicas do leite, para detecção de microrganismos causadores de mastite. Porém, este tipo de análises, por serem caras e morosas, são habitualmente efectuadas após a detecção de MSC, através de um dos outros métodos referidos. Através de análises microbiológicas é possível identificar o agente etiológico e estudar a sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Terapêutica

O tratamento da mastite pode resolver o problema da infecção intramamária mas, geralmente, não restitui o funcionamento da glândula afectada (Jones, 1991). Além disso, frequentemente a cura clínica não corresponde a uma cura microbiológica, verificando-se que, após suspensão da terapêutica, acontece um ressurgimento da sintomatologia, a que corresponde o isolamento do mesmo agente etiológico anteriormente identificado.

A mastite aguda nas ovelhas pode ser tratada com agentes antimicrobianos, por via endovenosa, oral ou intramamária (Radostits *et al.*, 2000). As preparações medicamentosas de aplicação intramamária para vacas podem ser usadas em ovinos; no entanto, o intervalo de segurança necessário para a completa eliminação do produto terá que ser mais longo do que o preconizado para bovinos (Buswel e Barber, 1989).

No caso de mastite hiperaguda com gangrena, a antibioterapia intramamária não é suficiente, visto que o edema na glândula prejudica a difusão do produto medicamentoso. É necessário tratamento sistémico com doses elevadas de antibiótico, de forma a atingir níveis terapêuticos do fármaco na glândula mamária.

Apesar de, presentemente, a utilização de antibióticos constituir o tratamento de eleição para as mastites, os resultados obtidos ficam longe do que seria desejável. Com efeito, o tratamento de animais durante a lactação, geralmente, não leva à cura, pois é difícil conseguir que o agente antimicrobiano utilizado

permaneça na glândula mamária em doses terapêuticas durante o tempo suficiente, devido à quantidade de leite presente e ao efeito mecânico do fluxo do leite e da ordenha. Mesmo o tratamento durante o período seco muitas vezes não resolve casos de mastite crónica, principalmente quando o agente etiológico apresenta mecanismos de sobrevivência como a capacidade para produzir biofilme ou a possibilidade de sobreviver dentro das células epiteliais ou mesmo das células fagocitárias, como é o caso de *Staphylococcus aureus*.

Além do referido, se não forem cumpridos os intervalos de segurança, a utilização de antibióticos é responsável pela contaminação do leite com resíduos que são prejudiciais ao consumidor. A utilização de um agente antimicrobiano exerce uma pressão de selecção sobre as populações microbianas para estirpes resistentes a esse e a outros agentes antimicrobianos (Costa, 2005). Este aspecto interfere negativamente sobre o problema do controlo de mastites (Rajala-Schultz *et al.*, 2005; Boutet e Lekeux, 2005), mas também pode favorecer a emergência de estirpes multirresistentes com impacto em saúde pública (Angulo *et al.*, 2004; Tollefson e Karp, 2004).

Por estas razões, entre outras, está actualmente muito valorizada a produção biológica de animais, cujo manejo restringe a utilização de antibióticos e outros produtos, com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores de produtos de origem animal. A utilização de terapêuticas de mastite, alternativas aos antibióticos, tem sido amplamente estudada. Várias substâncias têm sido testadas quanto à sua acção bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos causadores de mastite, entre as quais algumas bacteriocinas. Bacteriocinas são péptidos biologicamente activos, produzidos por microrganismos, que têm propriedades bactericidas contra outras espécies estreitamente relacionadas com a estirpe produtora, sendo algumas bacteriocinas também activas contra estirpes distanciadas filogeneticamente (González-Martínez *et al.*, 2003).

A nisina, um péptido de cadeia curta produzido por *Lactococcus lactis* var. *lactis*, inibe o crescimento *in vitro* de várias bactérias Gram-positivas causadoras de mastites, mas não é eficaz contra Gram-negativos (Broadbent *et al.*, 1989). Outras bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* var. *lactis* são as lactocinas, que também exibem acção bactericida *in vitro* contra vários agentes

patogénicos isolados de leite de animais com mastite (Ryan *et al.*, 1998; Sharma e Malik, 2005) e cuja administração intramamária a animais mastíticos resulta na recuperação de 50% dos animais (Sharma e Malik, 2005). Um estudo recente demonstrou que a infusão intramamária de uma cultura viva de *Lactococcus lactis* reduz em 50% os casos de MSC e em 77% os casos de MC em bovinos (Crispie *et al.*, 2005a), porém esta espécie já foi referida como agente de MSC em ovelhas (Pengov, 2001).

Uma outra proteína bacteriana, a lisostafina produzida por *Staphylococcus simulans*, tem um efeito bactericida sobre *Staph. aureus* e foi já testada na terapêutica de vacas com mamite clínica, causada por *Streptococci* (Oldham e Daley, 1991) e por *Staph. aureus* (Komine *et al.*, 2006). Através de engenharia genética, Robert Wall e colaboradores (2005) produziram vacas transgênicas que produzem 0,9 a 14 mg de lisostafina por mililitro de leite, a qual demonstrou capacidade *in vitro* para lisar *Staph. aureus*. Estas vacas, quando experimentalmente infectadas com *Staph. aureus*, não desenvolveram mastite, contrariamente aos animais no grupo de controlo. Ainda com o objectivo de produzir vacas transgênicas resistentes a mastites, através da expressão de substâncias antimicrobianas no leite, foi criada, por engenharia genética, uma substância resultante da fusão de lisostafina com a endocina produzida por um bacteriófago de *Streptococcus agalactiae* (Donovan *et al.*, 2006).

Além das bacteriocinas, outros produtos têm sido testados quanto à sua eficiência para o tratamento de mastite. Um produto à base de enxofre e ácido salicílico, cuja aplicação é feita topicamente no quarto/metade afectada, foi testado com bons resultados em vacas e é recomendado para ovelhas (Burgess, 1991). O produto da digestão pela quimosina da α -caseína-s1, isracidina, injectado no úbere de ovelhas pode ser utilizado como terapêutica ou para profilaxia (Lahov e Regelson, 1996).

Também como tratamento alternativo à utilização de antibióticos e, especificamente, para o tratamento de animais explorados de modo biológico, alguns autores propõem terapia homeopática, para conseguir reduzir em 25% a utilização de antibióticos (Fidelak *et al.*, 2005). A utilização de ervas tradicionais chinesas, para a terapêutica de vacas com mastite clínica causada por *Staph.*

aureus, resultou numa taxa de cura clínica de 81% e uma taxa de cura bacteriológica de 40% (Han e Han, 2005).

O recurso a citocinas para o tratamento da mastite tem sido alvo de estudo dos investigadores nos últimos 15 anos. Citocinas são glicoproteínas segregadas por variados tipos de células que, ao ligar-se a receptores específicos na membrana da mesma célula, de células vizinhas ou de outras à distância, induzem uma actividade por parte desta última célula, que pode ser diversa. As citocinas servem de mediadores inter-celulares e têm um papel fundamental em todos os mecanismos de defesa do hospedeiro, visto que regulam a actividade das células que participam tanto na resistência inata, como na imunidade adaptativa. A secreção de citocinas pode ser estimulada por acção de microrganismos ou outras citocinas produzidas por outras células, mas os avanços na tecnologia da recombinação de DNA já permitem a produção de grandes quantidades de citocinas recombinantes (Sordillo, 1997).

Trabalhos sobre o efeito das citocinas na glândula mamária e sobre os agentes causadores de mastite têm sido amplamente desenvolvidos em vacas. A capacidade, *in vitro*, para produzir a morte intra-celular de *Staph. aureus* fagocitados por PMNs circulantes é intensificada quando estas células são previamente incubadas com factor de necrose de tumores- α (TNF- α). Esta citocina também aumenta a capacidade que certos antibióticos têm para lisar *Staph. aureus* intracelularmente (Sanchez *et al.*, 1994). As duas competências referidas também foram demonstradas por acção de interleucina-1 β (IL-1 β) (Sanchez *et al.*, 1994). A infusão intramamária de IL-1 β em quartos mamários infectados experimentalmente com *Staph. aureus* é pouco eficiente, visto que de 83% de glândulas curadas clinicamente, só 42% corresponderam a cura bacteriológica (Daley *et al.*, 1991). No entanto, em combinação com o tratamento antibiótico tradicional, aumentou a eficácia terapêutica em 55% de casos de mastite causada por *Staph. aureus* (Coyle *et al.*, 1992).

A administração intramamária de interleucina-2 (IL-2) induz a activação de neutrófilos no leite (Daley *et al.*, 1991) e o aumento da sua acção bactericida (Wedlock *et al.*, 2000). A sua administração terapêutica em quartos infectados pode ser benéfica em associação com antibióticos (Daley *et al.*, 1992). A

utilização de antibiótico associado a IL-2, para o tratamento de vacas com mastite a *Staph. aureus* durante o período seco, relativamente a animais tratados só com antibiótico, resultou num menor número de infecções após o parto (Furda *et al.*, 1992).

Não foi encontrada qualquer referência à utilização de citocinas para o tratamento de mastite ovina, porém, num estudo efectuado em ovelhas com mastite aguda, induzida experimentalmente durante a fase seca, utilizando *Staph. aureus* e *E. coli*, foi sugerido que existe uma relação estreita entre a concentração de IL-1 β e IL-8 na glândula mamária e a intensidade da infiltração linfocitária (Waller e Colditz, 1999) e, após a infecção experimental da glândula mamária de ovelhas com *Staph. epidermidis*, os autores associaram a presença de microrganismos na glândula com a presença de IL-8 e elevada CCS, tendo atribuído à IL-1 β a evolução favorável da infecção para a cura (Winter *et al.*, 2003; 2005).

Profilaxia

A prevenção das doenças é sempre a forma de controlo mais desejada, visto ser mais económica, além de mais adequada em termos de bem-estar animal. No caso da mastite, este aspecto torna-se ainda mais relevante, uma vez que os danos provocados por esta afecção na glândula mamária são irreversíveis e a produção nas lactações seguintes é sempre afectada em maior ou menor grau, conforme a extensão do epitélio mamário destruído. A profilaxia das mastites pode ser desenvolvida com o recurso a medidas de profilaxia sanitária e a acções de profilaxia médica.

Profilaxia Sanitária

A aplicação de medidas higio-sanitárias com vista a impedir a invasão da glândula mamária pelos agentes microbianos é a chave da prevenção das mastites. Estas medidas de manejo irão contrariar as causas predisponentes já referidas, diminuindo a possibilidade de acesso dos microrganismos à glândula mamária e/ou melhorando a capacidade de resistência do animal à doença.

O programa de controlo de mastite a aplicar aos efectivos leiteiros ovinos pode ser determinado por adaptação de programas estabelecidos para bovinos, cuja eficiência está amplamente comprovada. O “plano de controlo de 5 pontos”, estabelecido pelo National Institute of Research in Dairying (Radostits *et al.*, 2000), encerra as medidas fundamentais para o controlo de mastite: [1] Higiene do úbere e da ordenha; [2] equipamento de ordenha convenientemente instalado, em perfeito estado de funcionamento e manutenção; [3] tratamento de secagem; [4] tratamento eficiente de mastites clínicas durante a lactação e [5] refugio de animais com infecções crónicas. Este plano resume as medidas preconizadas num programa para controlo de mastites em pequenos ruminantes (Aparício *et al.*, 2005) que compreende os seguintes aspectos: rotina de ordenha cuidada; desinfecção dos tetos após a ordenha por imersão numa substância antisséptica; execução da ordenha ordenadamente, ordenhando animais com mastite no final; revisão da máquina de ordenha; tratamento de secagem e refugio de animais com infecções crónicas, além do uso de autovacinas para mastites estafilocócicas e mastites a *Mycoplasma*, esta uma acção de profilaxia médica.

Assim:

1 – A higiene do úbere e da ordenha incluem a rotina de ordenha cuidada, a desinfecção dos tetos após a ordenha e a ordenha ordenada, tal como outras medidas de higiene referentes ao ordenhador e ao equipamento de ordenha. Como o tempo de ordenha das ovelhas é muito menor que o tempo de ordenha para as vacas, não é fácil adaptar uma rotina de ordenha higiénica semelhante. Menzies e Ramanon (2001) sugerem, antes da ordenha, só lavar e secar os úberes sujos ou funcionar com poucas unidades por ordenhador, para evitar que os úberes fiquem molhados, aumentando o risco de infecções intramamárias. A desinfecção dos tetos antes e após a ordenha reduz significativamente o número de microrganismos mesófilos no leite de ovelha (Pavicic *et al.*, 2005) e a desinfecção após a ordenha, está comprovado que reduz a CCS e a taxa de novas infecções em cabras (Paape *et al.*, 2001).

2 – É muito importante que equipamento de ordenha esteja convenientemente instalado e em perfeito estado de funcionamento e manutenção. O mau funcionamento e/ou utilização negligente do equipamento de ordenha podem

ocasionar lesões nos tetos as quais favorecem o início de infecções intramamárias e diminuem a capacidade de defesa ao nível do canal do teto, por danificarem o esfíncter e a camada de queratina. Além disso, flutuações no vácuo podem forçar a entrada de microrganismos no interior da glândula mamária (Peris *et al.*, 2001).

3 – O tratamento de secagem consiste na administração de compostos quimioterápicos no final da lactação. Este tratamento, nas ovelhas, pode ser efectuado por aplicação intramamária (Hueston *et al.*, 1989; Ahmad *et al.*, 1992b; Tietze *et al.*, 1993) ou por administração parenteral (McCarthy *et al.*, 1988; Cuccuru *et al.*, 1999) e produz redução na taxa de infecções intramamárias após o parto e diminuição da CCS no leite de conjunto, leite do tanque (De Santis *et al.*, 2005b).

4 – O tratamento eficiente de mastites clínicas durante a lactação é fundamental para não evoluírem para a cronicidade. Esta medida não é referida relativamente ao manejo de ovelhas leiteiras visto que, frequentemente, após a ocorrência de um episódio de mastite clínica, o animal não prossegue a lactação.

5 – O refugo das ovelhas afectadas é uma das medidas consideradas fundamentais por Radostits e colaboradores (2000), embora os autores considerem que, geralmente, não é suficiente para controlar a doença num efectivo.

Parece-nos adequado considerar, no âmbito da profilaxia sanitária, o manejo alimentar das fêmeas leiteiras, o qual deve fornecer ao animal os microelementos considerados importantes para um bom funcionamento da glândula mamária.

Alguns micronutrientes têm um poder imunorregulador e as respectivas carências repercutem-se sobre o estado sanitário da glândula mamária. É o caso do selénio, da vitamina E, da vitamina A, dos β -carotenos, do cobre e do zinco. Além disso, estas substâncias têm a capacidade de prevenir e inactivar os radicais livres de oxigénio. Durante o metabolismo celular normal e durante a inflamação formam-se radicais livres de oxigénio que danificam os tecidos através de peroxidação dos lípidos constituintes das membranas, inactivação e desnaturação de enzimas,



danificação do DNA e alteração de carboidratos que pode alterar a função de receptores celulares (Harmon, 1994).

O selênio (Se) é um componente do enzima anti-oxidante glutationa-peroxidase, o qual é essencial para a protecção das células, nomeadamente os neutrófilos, contra acção auto-oxidativa dos radicais de oxigénio. Em solos pobres em selênio, as pastagens não fornecem a quantidade necessária aos animais. Vários estudos têm documentado os benefícios da dieta suplementada com selênio no controlo de mastites em bovinos (Sordillo *et al.*, 1997). Em ovelhas, a administração intramuscular de selenito de sódio 30 dias antes do parto, a animais cuja alimentação era já suplementada com este microelemento, resultou numa melhoria da imunidade celular e num aumento da produção de leite em relação aos animais não tratados. No entanto, a CCS não foi significativamente afectada (Lacetera *et al.*, 1999).

A vitamina E, que tem propriedades biológicas semelhantes ao Se, é um importante constituinte das membranas celulares, além de ter um papel regulador na biossíntese de vários mediadores inflamatórios. Esta vitamina é importante para a integridade dos tegumentos, para a cicatrização de feridas e é capaz de estimular tanto a imunidade celular como humoral (Reddy *et al.*, 1987). A vitamina E aumenta a capacidade dos neutrófilos para destruir *Staph. aureus* e *E. coli*. A suplementação de vacas leiteiras com uma combinação de selênio e vitamina E, que têm efeito sinérgico, reduziu a prevalência de MSC, a taxa de novas infecções após o parto, a CCS e a duração e severidade de MC (Hogan *et al.*, 1993). Em ovelhas, a administração parenteral destes compostos, durante o período seco, diminuiu a CCS na lactação seguinte, mas não afectou a incidência de MC nem de infecção intramamária (Morgante *et al.*, 1999).

A vitamina A e o seu precursor β -caroteno são importantes para a integridade das mucosas, estimulam as células imunitárias e estão, geralmente, associados ao aumento da resistência às doenças. Deficiências nestes nutrientes têm sido associadas ao aumento da severidade das mastites (Sordillo *et al.*, 1997). O β -caroteno, independentemente da sua função de precursor da vitamina A, parece ter um efeito protector na glândula mamária, visto ter a capacidade de estimular

leucócitos circulantes e mamários, *in vitro*, para lisar *Staph. aureus* (Daniel *et al.*, 1991).

O cobre é necessário para a síntese de hemoglobina e é um elemento essencial do enzima anti-oxidante superóxido-dismutase dependente do cobre (Sordillo *et al.*, 1997). Deficiências em cobre em ruminantes podem diminuir a capacidade de macrófagos e neutrófilos para fagocitar e lisar os microrganismos, prejudicando a principal protecção da glândula mamária face à infecção por bactérias (Harmon e Torre, 1994). Em vacas, a suplementação com cobre reduziu a taxa de quartos infectados após o parto, tal como a taxa de infecções com agentes patogénicos maioritários (Harmon *et al.*, 1994a). A MC experimentalmente induzida com endotoxina resultou menos grave, com sinais clínicos menos marcados e menor CCS, em vacas suplementadas com cobre do que em animais não suplementados (Harmon *et al.*, 1994b). Embora não se tenha observado o mesmo efeito após infecção experimental com *Staph. aureus*, os animais suplementados revelaram números de microrganismos no leite mais baixos do que o grupo de controlo (Harmon *et al.*, 1994c). A utilização de proteinato de cobre como suplemento revelou uma menor proporção de quartos infectados após o parto em comparação com animais que receberam sulfato de cobre. A percentagem de quartos infectados com agentes patogénicos minoritários foi menor quando foi utilizado proteinato de cobre, mas as infecções com agentes patogénicos maioritários foram menos frequentes quando se usou sulfato de cobre (Harmon, 1998). Não foram encontradas referências à utilização de cobre para a profilaxia de mastites em ovinos.

O zinco também tem um papel anti-oxidativo visto que é um componente do enzima superóxido-dismutase Zn-dependente (Sordillo *et al.*, 1997). É essencial para a integridade da pele e necessário para a síntese da queratina que reveste internamente o canal do teto (Harmon e Torre, 1994; Spain *et al.*, 2005). A vulnerabilidade da glândula mamária aumenta se houver uma deficiente camada de queratina (Capuco *et al.*, 1992). Administrado a vacas leiteiras como suplemento da dieta, reduziu a CCS no leite (Andersson *et al.*, 2005) e a incidência de novas infecções intramamárias (Spain, 1993). A suplementação da dieta em ovelhas resultou num decréscimo da adesão *in vitro* de *Staph. xylosus* a

células do epitélio mamário. Este efeito foi mais acentuado em animais suplementados com zinco sob a forma de proteinato do que em ovelhas que receberam óxido de zinco (Saianda *et al.*, 1999).

O efeito anti-oxidante do ácido ascórbico sobre a glândula mamária de bovino com mastite aguda foi também investigado. Observou-se um aumento de imunoglobulina G1 (IgG1) no leite e verificou-se que a recuperação da taxa de produção de leite foi mais rápida em animais tratados com ácido ascórbico do que em animais que não receberam o tratamento (Chaiyotwittayakun *et al.*, 2002).

Profilaxia Médica

As medidas de profilaxia desenvolvidas através de actos médicos visam a manipulação do sistema imunológico de forma a potenciar a reacção imunitária que se estabelece em resposta a uma infecção. Agentes que modificam a resposta do hospedeiro face a microrganismos patogénicos com benefício para o primeiro são designados por modificadores da resposta biológica (Campos *et al.*, 1993).

As vacinas são modificadores da resposta biológica que potenciam a resposta imunológica específica. Porém, outras substâncias ou acções podem estimular as defesas não específicas do animal, entre as quais as citoquinas. Portanto, a capacidade natural da glândula mamária para se defender dos agentes causadores de mastite pode ser estimulada por diversos mecanismos.

A estimulação específica, através da utilização de vacinas, tem um valor relativamente limitado devido à grande variedade de agentes etiológicos e, mesmo em situações bem definidas em que se pretende protecção contra um determinado agente patogénico, a eficácia das vacinas, até à data desenvolvidas, não tem sido suficiente para conferir a protecção necessária. Uma boa vacina contra mastites deveria eliminar infecções crónicas, prevenir novas infecções e reduzir a frequência e gravidade de MC (Sordillo *et al.*, 1997).

Ao longo dos anos têm sido estudados vários antigénios vacinais, o que se repercutiu no desenvolvimento de vacinas anti-mastitíficas. Ensaio de vacinas com antigénios que induzem maior protecção do que os microrganismos inteiros,

como o exopolissacarídeo capsular de *Staphylococcus aureus*, revelaram bons resultados ao reduzir a incidência de MC causada pela infecção experimental com este agente patogénico (Watson, 1988; Amorena *et al.*, 1994) bem como a incidência de MSC induzida experimentalmente com *Staph. simulans* (Amorena *et al.*, 1994). Recentemente tem sido investigada a produção de vacinas de DNA constituídas com genes de adesinas microbianas cujo objectivo é induzir a produção de anticorpos para impedir a adesão dos microrganismos às células do epitélio mamário. A administração destas vacinas a ratos induziu a produção de imunoglobulinas capazes de inibir a adesão *in vitro* a células epiteliais (Castagliuolo *et al.*, 2005) e reduziu a infecção experimental em ratos e bovinos (Shkreta *et al.*, 2004; Castagliuolo *et al.*, 2005)

A utilização de autovacinas tem também sido preconizada por alguns autores. A infecção natural por *Mannheimia haemolytica* foi completamente evitada em ovelhas de carne (Kabay e Ellis, 1989) e a prevalência de MSC em ovelhas leiteiras da raça Assaf foi reduzida, tendo-se verificado um aumento de 13,5% na produção de leite dos animais vacinados, relativamente aos animais de controlo (Las Heras *et al.*, 2001).

A via de administração utilizada para a vacinação tem influência na resposta imunitária. A imunização local, através da instilação intramamária de antigénios durante o período seco, aumenta substancialmente a protecção na glândula mamária (Chang *et al.*, 1981; Colditz e Watson, 1985). A administração intramamária de *Staph. aureus* na glândula de rato induziu uma resposta humoral e uma resposta celular, aumentando também a produção de interferão- γ (IFN- γ) (Gómez *et al.*, 2002). Diversos locais de inoculação têm sido utilizados para a administração parenteral, nomeadamente a via intra-muscular na perna (Amorena *et al.*, 1994), a via intra-peritoneal (Kabay e Ellis, 1989) ou a via subcutânea. Neste caso, se o local de inoculação for na projecção do gânglio supra-mamário podem obter-se elevados níveis de anticorpos na secreção mamária (Colditz e Watson, 1985).

A estimulação inespecífica da glândula mamária induz mecanismos gerais de defesa, portanto, tem a vantagem de funcionar para toda uma panóplia de agentes etiológicos possíveis.

A utilização de citocinas, como medida profiláctica no controlo de mastites em bovinos, tem sido objecto de estudo nos últimos anos. A inoculação subcutânea de recombinante humana de factor estimulante das colónias de granulócitos (rhG-CSF), a vacas em lactação, reduziu em 46,7% a taxa de novas infecções intramamárias por *Staph. aureus*, devido ao aumento de neutrófilos na glândula mamária (Nickerson *et al.*, 1989c). A infusão intramamária de IL-1 β produziu um aumento de neutrófilos funcionalmente activados (Daley *et al.*, 1991; Coyle *et al.*, 1992) e conferiu uma protecção transitória face à infecção experimental por *Staph. aureus* (Coyle *et al.*, 1992). A administração profiláctica de IL-2 revelou proteger a glândula de subsequente infecção experimental com *Staph. aureus* (Sordillo, 1997), tendo a estimulação local da glândula mamária com esta citocina induzido um aumento da concentração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos no epitélio do teto e cisterna da glândula (Nickerson *et al.*, 1989b). Ainda, a activação *in vitro* de linfócitos mamários com IL-2 produziu um aumento da sua acção citotóxica e da sua capacidade para lisar *Staph. aureus*, através de um mecanismo extra-celular (Sordillo *et al.*, 1991). Também o INF- γ parece poder induzir a fagocitose na glândula mamária e regular a resposta inflamatória aguda face a toxinas bacterianas durante uma mastite coliforme aguda, pois a infusão intramamária de INF- γ antes da infecção experimental com *E. coli* resultou numa redução de quartos infectados, menor taxa de mastite clínica e infecções de duração mais curta em relação aos animais de controlo. Doses muito baixas produziram um aumento dos linfócitos locais, enquanto doses superiores não causaram alterações na qualidade do leite nem modificações histológicas no tecido mamário (Babiuk *et al.*, 1991).

Além dos aspectos referidos, as citocinas IFN- γ , IL-1 e IL-2 revelaram boas capacidades como adjuvantes de vacinas. IFN- γ é capaz de activar macrófagos e induzir a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. IL-1 estimula os linfócitos T aumentando também a resposta citotóxica e IL-2 actua tanto sobre linfócitos T como linfócitos B, exercendo um excelente efeito adjuvante sobre três mecanismos diferentes: citotoxicidade específica, proliferação celular e síntese de anticorpos (Campos *et al.*, 1993).

Outras substâncias podem actuar melhorando o desempenho do sistema imunitário, ao prolongar a vida das células envolvidas nos mecanismos imunológicos ou aumentar a sua eficiência. É o caso do levamisole que tem um poder modulador sobre a imunidade celular, a imunidade humoral e estimula a actividade celular de macrófagos e polimorfonucleares. Administrado por via oral a vacas com MSC, reduziu a CCS e a quantidade de microrganismos no leite. Em vacas saudáveis verificou-se um aumento significativo de imunoglobulinas no leite (Ishikawa *et al.*, 1982).

A acrescentar ao já referido efeito terapêutico, quando aplicada a animais infectados, a infusão intramamária, em bovinos, de uma cultura viva de *Lactobacillus lactis* demonstrou ter um efeito imunoestimulante, induzindo a chamada de PMNs à glândula mamária (Crispie *et al.*, 2005b). Contudo, como foi referido, esta espécie, pode provocar MSC em ovelhas (Pengov, 2001).

Na constante procura de novas alternativas para o tratamento e prevenção de mastites, Roth e colaboradores (2001) estudaram o efeito de soro de leite hiperimune ultrafiltrado sobre a actividade de neutrófilos circulantes de bovino. O referido soro foi produzido a partir de leite de vacas previamente imunizadas, através da instilação intramamária de vários agentes de mastite inactivados. A incubação *in vitro* de neutrófilos com este soro aumentou a sua capacidade de migração e de lisar os microrganismos fagocitados. Houve também maior produção de radicais livres de oxigénio, um aumento da desgranulação celular – libertação de mieloperoxidase dos lisozomas - e melhorou a acção citotóxica tanto dependente como independente de anticorpos (ADCC e AICC). Após inoculação subcutânea do mesmo produto em vacas no período peri-parto, foram recolhidos e analisados neutrófilos circulantes, os quais demonstraram um poder bactericida muito aumentado em relação ao grupo de controlo.

Vários métodos têm sido propostos para acelerar a involução mamária no final da lactação, pois a susceptibilidade a novas infecções é muito elevada durante este período. A infusão de endotoxina de *E. coli* e/ou colchicina (composto anti-mitótico), no início do período seco, aumentou o nível de células fagocitárias e de imunoglobulinas, além de encurtar este período (Oliver e Smith, 1982, citado por Colditz e Watson, 1985). Outras formas de produzir uma involução acelerada

consistem na administração de estrogénios ou na infusão intramamária de citocinas recombinantes bovinas, IL-1 β e IL-2 (Burton e Erskine, 2003).

A estimulação não específica através da utilização de dispositivos intra-mamários foi amplamente experimentada. O dispositivo intramamário consiste num pequeno objecto inerte, esterilizado, que é introduzido na cisterna da glândula através do canal do teto, com o objectivo de estimular um aumento do número de leucócitos na glândula mamária. Foram avaliados diferentes tipos de dispositivos: lisos, rugosos, impregnados de cobre, cobertos de enxofre. No entanto, apesar de induzirem um aumento de leucócitos, não conferem uma protecção razoável (Nickerson *et al.*, 1990) e podem traumatizar o epitélio e ocasionar hemorragias, responsáveis pela presença de sangue no leite (Kehrli e Harp, 2001). A utilização de dispositivos intra-mamários em ovelhas pode promover um efeito protector contra *Staph. aureus*, se a descarga de células somáticas atingir $1\ 000 \times 10^3$ células/mL de leite, e proteger da infecção por *Staph. epidermidis* se a CCS chegar a 200×10^3 . No entanto a produção e qualidade do leite são nefastamente afectadas (Penadés *et al.*, 1993).

1.3 – AGENTES ETIOLÓGICOS

Como foi referido anteriormente, são múltiplos os agentes etiológicos de mastite ovina. A mastite pode surgir como o resultado de manifestações locais ao nível da glândula mamária de uma doença infecto-contagiosa. Esta situação verifica-se nos casos de agaláxia contagiosa, provocada por *Mycoplasma agalactiae*, e de Maedi-Visna, provocada por um lentivirus. Além destes microrganismos, uma grande diversidade de bactérias aeróbias, principalmente Gram-positivas, mas também diversas espécies de bactérias Gram-negativas e, ainda que embora raramente, bactérias anaeróbias e fungos podem provocar mastite nas ovelhas.

Os géneros e espécies referidos na literatura consultada como agentes etiológicos de mastite ovina são abaixo apresentados segundo a ordem estabelecida na lista taxonómica do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2006).

Super-reino: *Eubacteria*

Filo: *Actinobacteria*

Classe: *Actinobacteria*, Subclasse: *Actinobacteridae*

Ordem: *Actinomycetales*, Subordem: *Actinomycinae*

Família: *Actinomycetaceae*

Género: *Arcanobacterium*

A palavra *Arcanobacterium* tem origem na conjugação da palavra latina *arcanus*, que significa reservado, misterioso, com a palavra grega *bakterion*, designação para pequena vara. As bactérias pertencentes ao género *Arcanobacterium* são bacilos finos, irregulares e pleomórficos, dispostos por vezes em forma de V, que assumem formas cocoides com uma incubação prolongada. São microrganismos Gram-positivos, não ácido-resistentes, não esporogéneos, imóveis, anaeróbios facultativos, que geralmente exibem resultado negativo no teste da catalase (Collins e Cummins, 1986a).

Arcanobacterium (Actinomyces, Corynebacterium) pyogenes é um organismo ubiqüitário e contaminante comum da pele dos animais, que pode constituir causa

primária ou secundária de uma grande variedade de infecções piogénicas nos ruminantes. Esta bactéria é um dos agentes etiológicos de mastite de Verão nas vacas (Radostits *et al.*, 2000). Nas ovelhas, pode induzir MC (Falade *et al.*, 1988) ou MSC (Jones, 1991; Rapoport *et al.*, 1999).

Ordem: *Actinomycetales*, Subordem: *Corynebacterineae*

Família: *Corynebacteriaceae*

Género: *Corynebacterium*

O nome *Corynebacterium* deriva das palavras gregas *coryne*, que significa cacete, e *bakterion*, designação para pequena vara. Os microrganismos pertencentes a este género são bacilos direitos ou ligeiramente encurvados, com topos arredondados e por vezes alargados, podendo apresentar formas elipsóides ou ovais. A sua característica morfologia de associação assemelha-se a paliçada, também com formas angulares em V e Λ . Estas bactérias são Gram-positivas, por vezes corando irregularmente e formando grânulos metacromáticos, não são ácido-resistentes, não são esporogéneas e são imóveis. Relativamente ao tipo respiratório, são geralmente anaeróbios facultativos, porém algumas espécies são aeróbias, sendo produtores de catalase (Collins e Cummins, 1986b).

A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente causal da linfadenite caseosa das ovelhas, provoca frequentemente lesões supurativas nos gânglios supramamários que podem afectar a produção de leite, embora não seja uma verdadeira mastite (Radostits *et al.* 2000). Porém, foi referido como agente de MSC por Las Heras *et al.* (1999a).

Outras espécies deste género foram identificadas em diversos trabalhos, representando 0,5 a 12% dos agentes responsáveis por MSC (Watson *et al.*, 1990; De La Cruz *et al.*, 1994; Mavrogenis *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998; Apolo *et al.*, 1999; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c), nomeadamente a espécie *Corynebacterium bovis* (Rapoport *et al.*, 1999; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c). Com base nas suas características fenotípicas e filogenéticas, foram propostas duas novas espécies associadas a MSC nas ovelhas: *C. mastitidis* (Fernández-Garayzábal *et al.*, 1997; Las Heras *et al.*, 1999b) e *C. camporealensis* (Fernández-Garayzábal *et al.*, 1998a; Las Heras *et*

al., 1999b), as quais são referidas em bibliografia posterior (Las Heras *et al.*, 1999a).

Família: *Nocardiaceae*

Género: *Nocardia*

O género *Nocardia* foi nomeado em homenagem ao médico veterinário francês Edmond Nocard. A morfologia deste género é característica, apresentando hifas rudimentares ou ramificadas que se fragmentam em pedaços bacilares ou cocoides. Estas bactérias são geralmente Gram-positivas, podendo variar, e algumas estirpes são parcialmente ácido-resistentes em algumas fases de crescimento. Não são esporogéneas, são imóveis, aeróbias e produtoras de catalase (Goodfellow e Lechevalier, 1986).

Estes microrganismos são agentes ambientais patogénicos oportunistas. *Nocardia sp.* foi apontado por Watson e colaboradores (1990) como causador de mastite em ovelhas, tendo apresentado uma frequência de isolamento de 2,4% no estudo referido.

Ordem: *Actinomycetales*, Subordem: *Micrococcineae*

Família: *Micrococcaceae*

Género: *Micrococcus*

A palavra *Micrococcus* provém do grego *micrus*, que significa pequeno, e *coccus*, cujo significado é grão. As bactérias pertencentes a este género são esféricas ou cocoides, designadas vulgarmente por cocos, com diâmetro compreendido entre 0,5 e 2,0 µm, ocorrendo principalmente em pares, tétradas ou cachos irregulares. São Gram-positivas, não esporogéneas, geralmente imóveis. São quimiorganotróficas de metabolismo estritamente oxidativo, aeróbias, produtoras de catalase e de reacção positiva ao teste da oxidase (Kocur, 1986).

Espécies pertencentes a este género podem ser agentes etiológicos de mastite ovina, representando 1,7% a 21% dos agentes isolados de MSC em diferentes estudos efectuados (Bor *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990; De La Cruz *et al.*, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c). A espécie

referida como causadora de mastite em ovelhas é ***Micrococcus luteus*** (De La Cruz *et al.*, 1994).

Género: *Kocuria*

O género *Kocuria* foi criado em 1995, integrando várias espécies anteriormente pertencentes ao género *Micrococcus*, o qual deu origem a quatro novos géneros após o resultado de análises filogenéticas e quimiotaxonómicas terem revelado que era muito heterogéneo (Stackebrandt *et al.*, 1995). Como tal, os microrganismos apresentam as características fenotípicas gerais descritas para o género *Micrococcus*.

A espécie ***Kocuria rosea*** (***Micrococcus roseus***) foi referida por De La Cruz e colaboradores como causadora de mastite em ovelhas (1994).

Filo: *Firmicutes*

Classe: *Bacilli*

Ordem: *Bacillales*

Família: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

A palavra *Bacillus* deriva do latim *bacillum*, que significa bastonete ou varinha. Os microrganismos pertencentes ao género *Bacillus* apresentam células de forma cilíndrica, com bordos que podem ser rectos ou arredondados, por vezes agrupados em cadeias. As suas dimensões podem variar entre 0,5 X 1,2 µm e 2,5 X 10 µm. As bactérias são Gram-positivas, esporogéneas e geralmente móveis. Quanto ao tipo respiratório, são aeróbios ou anaeróbios facultativos e a maioria das espécies produz catalase (Claus e Berkeley, 1986).

Espécies pertencentes a este género podem ser agentes etiológicos de MC (Falade *et al.*, 1988), designadamente ***Bacillus cereus*** (Ziluaga *et al.*, 1998), podendo também provocar MSC (Bor *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990).

Família: *Listeriaceae*

Género: *Listeria*

O género *Listeria* recebeu o nome de Lord Lister, o célebre cirurgião inglês. As bactérias pertencentes a este género são pequenos bacilos, isto é, apresentam forma cilíndrica, de molde regular, com topos arredondados, cujo diâmetro se situa entre 0,4 e 0,5 µm e o comprimento varia de 0,5 a 2,0 µm, podendo algumas células apresentar-se encurvadas. Estes microrganismos são Gram-positivos, não ácido-resistentes, acapsulados, não esporogéneos e são móveis. O seu tipo respiratório é aeróbio e anaeróbio facultativo (Seeliger e Jones, 1986).

A espécie *Listeria monocytogenes* é o agente da listeriose que, nas ovelhas, pode apresentar-se sob a forma encefálica ou abortiva. Este microrganismo pode ocasionar MSC em ovelhas (Tzora *et al.*, 1999; Schoder *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2004). Após inoculação experimental na glândula mamária de ovinos, desenvolveu-se MC com sintomatologia ligeira, em alguns, e MSC na maioria dos animais, tendo evoluído para a cronicidade, conforme observações histológicas que revelaram destruição alveolar e proliferação do tecido fibroso (Tzora *et al.*, 1999).

Família: *Staphylococcaceae*

Género: *Staphylococcus*

O nome *Staphylococcus* provém das palavras gregas *staphyle*, que significa cacho, e *coccus*, que designa grão. As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* são células esféricas com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Ocorrem individualmente, em pares ou tétradas, e dividem-se caracteristicamente em vários planos de forma a constituir cachos irregulares. Os *Staphylococci* são Gram-positivos, não esporogéneos, imóveis, anaeróbios facultativos e, geralmente, produtores de catalase. Estes microrganismos são quimiorganotróficos de metabolismo respiratório e fermentativo (Kloos e Schleifer, 1986).

A espécie *Staphylococcus aureus* é considerada como o principal agente etiológico de mastite nos ovinos, à semelhança do que acontece com os bovinos, (Radostits *et al.*, 2000). Esta espécie é produtora de coagulase, possuindo vários

outros factores de virulência que lhe permitem infectar, permanecer e danificar a glândula mamária, além de produzir várias toxinas e superantígenos que podem ser prejudiciais para o consumidor de leite. É o principal responsável por mastites clínicas nas ovelhas, como tem sido amplamente demonstrado, apresentando incidências até 20% de animais afectados e representando 32,2-84% dos agentes microbianos isolados (Falade *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1990; Indrebø, 1990; Jones, 1991; Mavrogenis *et al.*, 1995; Bergonier *et al.*, 1999; 2005a; Mørk *et al.*, 2005). Provoca mastite hiperaguda, gangrenosa, com taxas de mortalidade de 25 a 50%. Nas ovelhas que sobrevivem, o epitélio produtor das glândulas afectadas pode ficar parcialmente destruído, ou a mastite evolui para a forma crónica, reduzindo a produção de leite em 25 a 30% (Radostits *et al.*, 2000). *Staph. aureus* pode também provocar mastite subclínica, apresentando-se como agente etiológico em 1,5 a 19,3% dos casos investigados (Bor *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1991; Marco *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; Mavrogenis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Las Heras *et al.*, 1999a; Pengov, 2001), podendo chegar a 37% (Stefanakis *et al.*, 1995) ou 46% (Apolo *et al.*, 1999). Outra espécie coagulase positiva do género *Staphylococcus* referida como agente de MSC, é ***Staph. intermedius*** (Las Heras *et al.*, 1999a), espécie com particular relevância em medicina veterinária.

Várias espécies de ***Staphylococci* coagulase-negativos** podem actuar como agentes etiológicos de mastite em ovelhas e constituem a principal causa de MSC (Jones, 1991; Radostits, 2000; Menzies e Ramannon, 2001). Estes microrganismos são agentes que integram a flora normal da pele das ovelhas e, durante muito tempo, foram considerados não patogénicos. Diversos rastreios efectuados em diferentes partes do Mundo (Ahmad *et al.*, 1992b; De La Cruz *et al.*, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Hofer *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Burriel, 1997; Ziluaga *et al.*, 1998; Bergonier *et al.*, 1999; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Leitner *et al.*, 2001; Pengov, 2001) referem como causadores de MSC as espécies ***Staph. capitis*, *Staph. caprae*, *Staph. chromogenes*, *Staph. epidermidis*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. hyicus*, *Staph. lentus*, *Staph. lugdunensis*, *Staph. sciuri*, *Staph. simulans*, *Staph. warneri* e *Staph. xylosus***, tendo *Staph. epidermidis* revelado ser o agente envolvido em maior número de casos (De La Cruz *et al.*, 1994; Hofer *et al.*, 1995;

Ziluaga *et al.*, 1998; Bergonier *et al.*, 1999; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Pengov, 2001; Ariznabarreta *et al.*, 2002). Também existem referências de SCN responsáveis por MC em ovelhas (Gutierrez *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1991; Hofer *et al.*, 1995) tendo-se verificado que alguns destes agentes, inoculados experimentalmente na glândula mamária ovina, resultam no desenvolvimento de MC, designadamente *Staph. chromogenes* (Fthenakis e Jones, 1990b) e *Staph. haemolyticus* (Coni *et al.*, 1999).

Ordem: *Lactobacillales*

Família: *Aerococcaceae*

Género: *Aerococcus*

O género *Aerococcus* foi assim designado com origem na palavra grega *aēr*, que designa ar. As células bacterianas pertencentes a este género são esféricas, com 1,0 a 2,0 µm de diâmetro e têm uma forte tendência para se apresentar agrupadas em forma de tétradas, quando crescem em meios de cultura líquidos. Os *Aerococci* são Gram-positivos, não esporogéneos, imóveis e microaerófilos, quanto ao tipo respiratório. Estes microrganismos são produtores de pseudocatalase, pelo que podem apresentar uma reacção positiva fraca na prova da catalase, embora geralmente o resultado seja negativo (Evans, 1986).

A espécie *Aerococcus viridans*, antigamente considerada como contaminante quando isolada a partir de amostras clínicas, é causa pouco frequente de infecções em humanos (Ruoff, 2002) e tem sido referido como agente de MSC em vacas (Owens *et al.*, 1990; Devriese *et al.*, 1999). Foi citada por Ziluaga e colaboradores (1998) como agente de MSC nas ovelhas.

Família: *Enterococcaceae*

Género: *Enterococcus*

O género *Enterococcus* foi criado em 1984 e compreende os microrganismos anteriormente pertencentes ao género *Streptococcus*, estreptococos fecais e *Streptococci* do grupo D de Lancefield (Euzéby, 2005). As características gerais destes microrganismos são conforme se descreverão para o género *Streptococcus*.

Espécies pertencentes a este género podem ser agentes de MSC nas ovelhas (Watkins *et al.*, 1991; Marco *et al.*, 1993; Ziluaga *et al.*, 1998). São referidas as espécies ***Enterococcus faecalis*** (Watkins *et al.*, 1991; Ziluaga *et al.*, 1998) e ***Enteroc. faecium*** (Watkins *et al.*, 1991). Num rastreio levado a cabo no sul de Inglaterra, o autor refere “espécies fecais de estreptococos” como agentes predominantes de MSC (Watkins *et al.*, 1991), referindo-se, como se pode deduzir, a *Enterococci*.

Família: *Streptococcaceae*

Género: *Lactococcus*

As bactérias pertencentes ao género *Lactococcus* foram anteriormente designadas por estreptococos lácticos e possuem as características que descreveremos para o género *Streptococcus*, ao qual pertenceram até 1986 (Teuber e Geis, 2005).

Estes microrganismos estão normalmente associadas a produtos lácteos, mas já foram isoladas de casos de endocardite e várias outras infecções em humanos (Ruoff, 2002). Em 1932, Diernhofer referiu *Lactococcus sp.* associado a mastite bovina (Devriese *et al.*, 1999). A espécie ***Lactococcus lactis*** foi referida como agente de MSC em ovinos (Pengov, 2001).

Género: *Streptococcus*

O nome *Streptococcus* tem origem na palavra grega *streptus*, que significa enovelado. As células de *Streptococcus* são geralmente esféricas a ovóides, com diâmetro inferior a 2,0 µm, ocorrendo em pares ou cadeias, quando cultivadas em meios de cultura líquidos. Estas bactérias são Gram-positivas, não esporogéneas, geralmente imóveis, anaeróbias facultativas e não produzem catalase. Os *Streptococci* são quimiorganotróficos de metabolismo fermentativo (Hardie, 1986).

Diversas espécies pertencentes a este género são potenciais agentes de mastite clínica e subclínica em ovinos. O agente de mastite infecciosa ***Streptococcus agalactiae*** é transmitido do úbere de ovelhas infectadas a outras fêmeas pelas tetinas da máquina de ordenha, pelas mãos do ordenhador ou pelos panos de limpeza (Radostits *et al.*, 2000) e pode ser responsável por casos de MC (Falade

et al., 1988) ou de MSC (Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Bio *et al.*, 2005). Múltiplos registos atribuem a *Streptococcus spp.* a etiologia de MSC, apresentando frequências de isolamento entre 1,5% e 21,8% (Marco *et al.*, 1993; Tietze *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; Stefanakis *et al.*, 1995; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Apolo *et al.*, 1999; Leitner *et al.*, 2001; Pengov, 2001). As espécies citadas associadas à patologia da glândula mamária de ovino são ***Strep. dysgalactiae*** (Bor *et al.*, 1989), ***Strep. uberis*** (Watson *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1991; Rapoport *et al.*, 1999; Pengov, 2001), ***Strep. acidominimus***, ***Strep. sanguinis (sanguis)*** (Ziluaga *et al.*, 1998) e ***Strep. equinus (bovis)*** (Watkins *et al.*, 1991). Relativamente a esta espécie, verificou-se, através de análises de sequenciação do gene *sodA*, que *Strep. bovis* e *Strep. equinus* pertencem à mesma espécie. As duas estirpes tipo foram associadas no mesmo *cluster* correspondendo à espécie *Strep. equinus* (Poyart *et al.*, 2002).

Duas estirpes de *Streptococci* isoladas de MSC em ovelhas, impossíveis de identificar através de métodos bioquímicos convencionais, foram identificadas por sequenciação dos genes 16S RNAr como ***Strep. parasanguinis***, uma espécie de estreptococos que tem sido isolada em humanos (Fernández-Garayzábal *et al.*, 1998b; Las Heras *et al.*, 1998b) e está associada com o desenvolvimento de endocardite experimental em ratos (Burnette-Curley *et al.*, 1995). Mais recentemente, foi identificada uma nova espécie de estreptococos associada a MSC em ovelhas, a qual foi designada por ***Strep. equi subsp. ruminatorum*** (Fernández *et al.*, 2004).

Relativamente a MC causada por espécies de *Streptococci*, Las Heras e colaboradores (2002) referem um surto de MC com 22% de morbilidade devido a ***Strep. equi subsp. zooepidemicus***, em que, apesar de a taxa de mortalidade ser nula, nenhuma das glândulas mamárias afectadas recuperou a função secretora e Scott (2000) refere um caso de mastite crónica associada a pleurisia fibrinosa em ovelhas devido a ***Strep. dysgalactiae***. Um outro estudo sobre a dinâmica da mastite subclínica, relata que animais infectados com ***Strep. equinus (bovis)*** desenvolveram MC grave (Watkins *et al.*, 1991).

Classe: *Clostridia*

Ordem: *Clostridiales*

Família: *Clostridiaceae*

Género: *Clostridium*

O nome *Clostridium* provem das palavras gregas *closter* e *dim* e significa pequeno fuso. Os microrganismos pertencentes a este género são bacilos Gram-positivos, por vezes difíceis de reconhecer por não se verem células coradas positivamente. São esporogéneos e podem ser imóveis ou móveis, usualmente por possuírem flagelos peritricos. Geralmente são anaeróbios estritos, porém a tolerância ao oxigénio é muito variável, tendo mesmo algumas espécies a capacidade de crescer na presença de oxigénio, apesar de não produzirem esporos nestas condições. Vulgarmente, não possuem catalase. Contudo, em algumas espécies, é possível detectar vestígios deste enzima (Cato *et al.*, 1986).

A espécie ***Clostridium perfringens*** é a única bactéria anaeróbia referida como agente etiológico de mastite ovina. Este microrganismo é raramente isolado de casos de MC mas provoca uma mastite hiperaguda altamente fatal com sintomatologia exuberante, nomeadamente manifestações hemolíticas, hemoglobulinúria, icterícia, anemia, anorexia e depressão (McDonnell e Holmes, 1990). Ao nível do úbere e do leite, as alterações são também muito evidentes (Radostits *et al.*, 2000). A taxa de mortalidade dos animais afectados pode chegar aos 100% (Indrebø, 1990).

Filo: *Proteobacteria*

Classe: *Betaproteobacteria*

Ordem: *Burkholderiales*

Família: *Burkholderiaceae*

Género: *Burkholderia*

O género *Burkholderia*, nomeado em homenagem ao microbiologista norte-americano Walter Burkholder, foi criado em 1993 englobando, na altura, sete espécies anteriormente pertencentes ao género *Pseudomonas*. Estas bactérias são bacilos Gram-negativos, não esporogéneos, móveis, graças a um ou vários flagelos polares, à excepção de *P. mallei* que é imóvel, visto ser desprovida de

flagelos. São aeróbios estritos, produtores de catalase e de reacção variável ao teste da oxidase (Euzéby, 2004).

A espécie anteriormente conhecida por *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* é, de facto, um conjunto de espécies genómicas diferentes, actualmente designada por complexo *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia cepacia sensu lato* é uma bactéria fitopatogénica que afecta as cebolas, a qual nos últimos anos emergiu como patogénico oportunista para os humanos, tendo sido também referido como causador de pneumonia e endocardite em cavalos. As espécies *Burkholderia cepacia* genovariedade III e *Burkholderia vietnamiensis* (*Burkholderia cepacia* genovariedade V) foram identificadas como agentes etiológicos de um surto de MSC em ovelhas, associado à utilização de tratamento de secagem com uma preparação medicamentosa, a cujo princípio activo o agente era resistente (Berriatua *et al.*, 2001). A genovariedade III veio depois a ser denominada por *Burkholderia cenocepacia* (Vandamme *et al.*, 2003).

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordem: *Enterobacteriales*

Família: *Enterobacteriaceae*

As enterobactérias, pertencentes aos diferentes géneros incluídos na família *Enterobacteriaceae*, apresentam características comuns. Todas são bacilos Gram-negativos, não ácido-resistentes, não esporogéneas, podendo ser imóveis ou móveis, graças a flagelos peritricos. Crescendo tanto na presença como na ausência de oxigénio, são quimiorganotróficas de metabolismo respiratório e fermentativo, produtoras de catalase e não reactivas no teste da oxidase. Geralmente crescem profusamente no meio de MacConkey (Brenner, 1984).

Género: *Enterobacter*

A palavra *Enterobacter* deriva das palavras gregas *enteron*, que significa intestino, e *bacter*, equivalente a *bacterion*, que designa pequena vara. Estes microrganismos correspondem à descrição das características gerais das enterobactérias, com dimensões compreendidas entre os limites 0,6 e 1,0 µm por 1,3 a 3,0 µm, sendo dotadas de flagelos peritricos que lhes conferem motilidade (Richard, 1984).

As bactérias pertencentes a este género, ***Enterobacter spp.***, podem ser agentes etiológicos de mastite ovina, conforme é referido por Watson e colaboradores (1990).

Género: *Escherichia*

O género *Escherichia* recebeu o nome de Theodor Escherich, que isolou a estirpe tipo deste género. As células bacterianas são conforme as características gerais descritas para as enterobactérias, com 1,1 a 1,5 µm de diâmetro por 2,0 a 6,0 µm de comprimento, ocorrendo individualmente ou em pares e de motilidade variável (Ørskov, 1984a).

A espécie ***Escherichia coli*** é um microrganismo abundante no meio ambiente e é o agente de mastite ambiental mais frequentemente isolado em bovinos. Nas ovelhas, pode estar implicado em casos de MC (Indrebø, 1990; Watkins *et al.*, 1991) ou de MSC, representando 0,5 a 1% dos isolados (Bor *et al.*, 1989; Mavrogenis *et al.*, 1995; Apolo *et al.*, 1999; Rapoport *et al.*, 1999; Pengov, 2001).

Género: *Klebsiella*

O género *Klebsiella* foi assim designado em homenagem ao microbiologista alemão, Edwin Klebs (1834-1913). Estes microrganismos são bastonetes com 0,3 a 1,0 µm por 0,6 a 6,0 µm, ocorrendo individualmente, em pares ou cadeias curtas e são imóveis. Enquadram-se na descrição apresentada para a família *Enterobacteriaceae* (Ørskov, 1984b).

Microrganismos pertencentes a este género são por vezes referidos como agentes de MSC nas ovelhas (Rapoport *et al.*, 1999), designadamente a espécie ***Klebsiella pneumoniae*** (Menzies e Ramanoon, 2001).

Género: *Proteus*

Com origem na mitologia grega, o género *Proteus* recebeu o nome de um deus do mar que tinha a capacidade de assumir diversas formas. Estes microrganismos têm 0,4 a 0,8 µm de diâmetro por 1,0 a 3,0 µm de comprimento, são móveis e apresentam as características gerais da família *Enterobacteriaceae* (Penner, 1984).

Espécies pertencentes a este género, *Proteus spp.*, são frequentemente referidas como agente de MSC nas ovelhas (Burriel, 1997; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c).

Género: *Serratia*

O género *Serratia* foi nomeado em tributo ao físico italiano, Serafino Serrati. As bactérias pertencentes a este género têm as características gerais da família a que pertencem, cujos bacilos apresentam bordos arredondados e dimensões na ordem dos 0,5 a 0,8 µm por 0,9 a 2,0 µm. Geralmente são móveis (Grimont e Grimont, 1984).

Microrganismos pertencentes a este género foram referidos como agentes de MSC em ovelhas (Bor *et al.*, 1989). A espécie *Serratia marcescens* é um agente ambiental, patogénico oportunista que apresentou uma frequência de 5,3% num rastreio de MSC (Dario *et al.*, 1996). Tzora e Fthenakis (1999) relatam um surto de MC em ovelhas leiteiras causado por este agente, com uma taxa de incidência de 5,1%, tendo verificado, no mesmo efectivo, uma taxa de prevalência de MSC de 15,5%.

Ordem: *Pasteurellales*

Família: *Pasteurellaceae*

Género: *Actinobacillus*

A palavra *Actinobacillus* provém da palavra grega *aktinos*, que se refere a raio, conjugada com a palavra latina *bacillum*, que significa varinha ou bastonete. Neste género, as células bacterianas são esféricas, ovais ou bacilares, com 0,3 a 0,5 µm por 0,6 a 1,4 µm, podendo ocasionalmente alongar-se a 6,0 µm. Ocorrem individualmente, em pares ou raramente em cadeias e frequentemente assumem uma disposição em que elementos bacilares são intercalados por formas cocoides, assemelhando-se à caligrafia do código de Morse. São Gram-negativas, não ácido-resistentes, não esporogéneas e imóveis. São aeróbias facultativas, quimiorganotróficas de metabolismo fermentativo e revelam reacção variável a ambos os testes catalase e oxidase (Phillips, 1984).

A espécie *Actinobacillus lignieresii* está geralmente associado a lesões dos tecidos moles na cabeça dos animais. Porém, foi isolada a partir de amostras de leite de ovelhas com mastite clínica, originárias de oito efectivos diferentes, cujas taxas de morbilidade se situaram entre 1% e 10% e as taxas de mortalidade variaram de 0,23% a 4,1%. A inoculação experimental desta bactéria em três ovelhas com 9, 58 e 105 dias de lactação, originou mastite hiper-aguda, mastite aguda e mastite subclínica, respectivamente (Laws e Elder, 1969). Após inoculação experimental da espécie *Actinobacillus seminis* na glândula mamária de ovelha desenvolveu-se uma mastite aguda purulenta (Alsenosy e Dennis, 1985). Watson *et al.* (1990) referem *Actinobacillus spp.* como agentes de mastite ovina.

Género: *Histophilus*

O nome *Histophilus* deriva da conjugação das palavras gregas *histos*, que significa tecido, e *philos*, que indica amigo. Estas bactérias são de morfologia bacilar ou cocobacilar, com 0,3 a 0,7 µm por 0,5 a 2,0 µm, Gram-negativos, não ácido-resistentes, não esporogéneos e imóveis. São microaerófilos, aeróbios facultativos, não produzem catalase e a reacção ao teste da oxidase é geralmente positiva (Kilian e Biberstein, 1984; Angen *et al.*, 2003).

A única espécie do género, *Histophilus somni (ovis)* é um agente piogénico, causador ocasional de mastite aguda gangrenosa (Webb, 1983; Radostits *et al.*, 2000).

Género: *Mannheimia*

O género *Mannheimia* foi nomeado em tributo a Walter Mannheim, um microbiologista alemão que estudou a taxonomia da família *Pasteurellaceae*. A espécie anteriormente designada por *Pasteurella haemolytica* foi avaliada por sequenciação de 16S RNAr e hibridização DNA-DNA, tendo-se verificado que incluía distintos grupos genómicos e fenotípicos. As estirpes anteriormente pertencentes ao biótipo T estão, desde 1990, incluídas no género *Pasteurella trehalosi*. Dos 17 serotipos anteriormente descritos para o biótipo A, os serotipos 3, 4, 10 e 15 estão actualmente classificados como *Pasteurella trehalosi*, os serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 16 estão incluídos na espécie *Mannheimia*

haemolytica e o serogrupo 11 está reclassificado como *M. glucosida*. Não encontramos referências à reclassificação do serotipo 17. As bactérias pertencentes ao género *Mannheimia* são bacilos ou cocobacilos Gram-negativos, não esporogéneos, imóveis, anaeróbios facultativos ou microaerófilos. A reacção que apresentam no teste da oxidase é geralmente positiva, podendo no entanto variar (Angen *et al.*, 1999).

A bibliografia refere frequentemente *Pasteurella haemolytica* como agente etiológico de MC, podendo representar até 32,8% dos agentes isolados (Jones, 1991), induzindo, geralmente, mastite hiperaguda, gangrenosa. A sua ocorrência não está relacionada com falta de higiene (Radostits, *et al.*, 2000), mas antes associada à flora normal do tracto respiratório superior dos borregos que, provavelmente, constituem a fonte de infecção (Menziez e Ramanan, 2001). Por essa razão é mais frequente em ovelhas de carne do que em ovelhas leiteiras (Lanyon, 1989). Vários autores referem *Pasteurella haemolytica* como agente etiológico de MSC nas ovelhas, sem indicar o biotipo/serotipo dos isolados (Bor *et al.*, 1989; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998). É possível, em alguns casos, inferir da bibliografia que *Mannheimia haemolytica* foi isolada a partir do leite de ovelhas com MC aguda (Shoop e Myers, 1984) e de ovelhas com MSC (Watkins *et al.*, 1991). A inoculação experimental de apenas 10 unidades formadoras de colónia de *M. haemolytica*, por instilação intramamária produz MC (El-Masannat *et al.*, 1991). O serotipo 11 de *Pasteurella haemolytica*, hoje denominado *Mannheimia glucosida*, é também referido como agente etiológico de MSC em ovelhas (Watkins *et al.*, 1991).

Género: *Pasteurella*

O género *Pasteurella* recebeu o nome em homenagem a Louis Pasteur. Os microrganismos pertencentes a este género são esféricos, ovóides ou bacilares, com 0,3 a 1,0 µm de diâmetro por 1,0 a 2,0 µm de comprimento, ocorrendo individualmente ou, menos frequentemente, em pares ou cadeias curtas. São Gram-negativos, de típica coloração bipolar, não ácido-resistentes e imóveis. Quanto ao tipo respiratório, são anaeróbios facultativos, de metabolismo fermentativo. São produtores de catalase e, geralmente, apresentam resultado positivo no teste da oxidase (Carter, 1984).

Como agentes de mastite nas ovelhas foi referida a espécie *Pasteurella multocida*, identificada num rastreio na Austrália, em que foi isolado com uma frequência de 2,4% (Watson *et al.*, 1990).

Ordem: *Pseudomonadales*

Família: *Moraxellaceae*

Género: *Acinetobacter*

A palavra *Acinetobacter* tem origem na palavra grega *akinetos*, que significa incapaz de se mover, conjugada com a palavra *bacter*, referente a pequena vara. As células dos microrganismos incluídos neste género são bacilares, com 0,9 a 1,6 µm por 1,5 a 2,5 µm, adquirindo a forma esférica na fase estacionária do crescimento bacteriano. São Gram-negativos, mas por vezes difíceis de decorar. Geralmente, ocorrem em pares e em cadeias de comprimento variável. Não são esporogéneos e são móveis. São aeróbios com tipo de metabolismo estritamente respiratório, produtores de catalase e negativos no teste da oxidase (Juni, 1984).

Acinetobacter spp. ocorre naturalmente no solo e na água e tem sido frequentemente isolado de várias áreas do corpo humano, permanecendo a dúvida sobre se é comensal ou contaminante. Apesar de geralmente ser considerado não patogénico, pode causar infecções nosocomiais nos humanos (Juni, 1984), pode ser agente de MSC em cabras (Ndegwa *et al.*, 2001) e foi referido como representando 4,7% dos isolados num rastreio de mastites em ovelhas (Watson *et al.*, 1990).

Família: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas*

O nome *Pseudomonas* deriva da conjugação das palavras gregas *pseudes*, que significa falso, e *monas*, que se refere a unidade. As bactérias pertencentes a este género são bacilos diretos ou ligeiramente encurvados com 0,5 a 1,0 µm de diâmetro por 1,5 a 5,0 µm de comprimento, Gram-negativos, não esporogéneos. Podem ser móveis, graças a um ou vários flagelos polares ou, raramente, imóveis. São aeróbios de metabolismo estritamente respiratório, não produtoras de catalase, podendo apresentar resultados variáveis ao teste da oxidase (Palleroni, 1984).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* provoca geralmente mastite clínica nas ovelhas (Falade et al., 1988; Watson et al., 1990; Las Heras et al., 1999b), gangrenosa e letal. Os sintomas locais são acompanhados de claudicação do membro referente à glândula afectada (Radostits et al., 2000). Após um surto de MC, o microrganismo permanece no efectivo como agente de MSC e a sua erradicação é muito difícil (Rapoport et al., 1999). Outros autores referem *Pseudomonas aeruginosa* como agente de MSC (Bor et al., 1989; González-Rodríguez, et al., 1995). Geralmente, a infecção deve-se à administração de preparações intramamárias sem os devidos cuidados de higiene ou à utilização de água contaminada, para lavagem dos úberes e/ou equipamento de ordenha (Las Heras et al., 1999b), mas nem sempre essa origem é facilmente comprovada (Rapoport et al., 1999).

Super-reino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*, Sub-filo: *Pezizomycotina*

Classe: *Eurotiomycetes*

Ordem: *Eurotiales*

Família: *Trichocomaceae* (*Trichocomaceae* mitospóricos)

Género: *Aspergillus*

As infecções micóticas nos animais são frequentemente secundárias a tratamentos antibióticos que, por não afectarem estes organismos, favorecem o seu crescimento ao inibirem as bactérias, suas competidoras. Estão descritos surtos de MC em ovelhas, causados pela espécie *Aspergillus fumigatus*, com taxas de morbidade entre 2% e 36,4%, podendo a taxa de mortalidade atingir 82% dos animais afectados. Estas infecções estão associadas à administração pouco cuidada e não higiénica de tratamento de secagem (Pérez et al., 1998; Las Heras et al., 2000).

Filo: *Ascomycota*, Sub-filo: *Saccharomycotina*

Classe: *Saccharomycetes*

Ordem: *Saccharomycetales*

As leveduras têm também sido referidas como agentes etiológicos de mastite nas ovelhas, podendo provocar MSC (González-Rodríguez *et al.*, 1995; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c) e até MC, como refere Ziluaga *et al.* (1998). Porém, a bibliografia consultada não menciona a respectiva identificação.

1.4 – FACTORES DE VIRULÊNCIA EM AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

Um agente patogénico pode ser definido como um microrganismo capaz de causar dano no organismo hospedeiro, o qual resulta directamente da acção do próprio micróbio e/ou da reacção de defesa do hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 1999).

A patogenicidade de um agente etiológico ou capacidade de causar dano no hospedeiro depende da virulência desse agente patogénico. A virulência, por seu lado, é determinada por três factores: (1) a infecciosidade, que corresponde à capacidade do agente em questão colonizar, isto é, estabelecer um foco de infecção; (2) a capacidade invasora, que é a capacidade de um microrganismo passar do local onde se encontra para as células/tecidos adjacentes e, por último, (3) o potencial patogénico, que determina o grau de indução de alterações mórbidas no hospedeiro (Prescott *et al.*, 2002).

Para induzir doença, o agente patogénico tem que ter acesso ao hospedeiro, colonizar, multiplicar-se, ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro e possuir capacidade mecânica, química ou molecular para danificar o hospedeiro. Estruturas do próprio microrganismo e produtos por ele elaborados que lhe permitem ou facilitam transpor estas etapas são factores de virulência.

Colonização

De modo a estabelecer um foco de infecção, o agente invasor utiliza factores de virulência que facilitam a sua adesão às células do hospedeiro, chamados adesinas.

Já foi descrita a colonização da glândula mamária sem prévia adesão (Anderson, 1978). Porém, para resistir ao efeito mecânico exercido pelo fluxo do leite, as adesinas têm um papel muito importante. A capacidade de adesão de agentes etiológicos de mastite em ruminantes, a células do epitélio mamário, tem sido amplamente investigada. Esta aptidão foi confirmada em *Staphylococcus aureus* em ensaios *in vivo* (Gudding *et al.*, 1984) e em culturas de células do epitélio

mamário (Iturralde *et al.*, 1993; Cifrian *et al.*, 1994; Hensen *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003). Também em ensaios *in vitro* foi demonstrada a capacidade para aderir a células mamárias em estafilococos coagulase negativos (Saianda, 1997; Almeida e Oliver, 2001), *Streptococcus dysgalactiae* (Calvinho *et al.*, 1998), *Strep. uberis* (Oliver *et al.*, 1998), *Escherichia coli* (Dopfer *et al.*, 2000) e *Mannheimia haemolytica* (Vilela, 1993). Porém, o agente de mastite contagiosa *Strep. agalactiae* mostra fraca adesão a células do epitélio de glândula mamária em cultura (Lammers *et al.*, 2001).

As adesinas bacterianas classificam-se em dois grupos principais, fímbrias e adesinas não fímbricas (Finlay e Falkow, 1997).

Fímbrias são estruturas tubulares, flexíveis ou rígidas, ancoradas na parede celular, constituídas por uma ou mais subunidades proteicas. A subunidade no topo da fímbria tem a função de adesina, ligando-se a receptores específicos nas células do organismo hospedeiro (Finlay e Falkow, 1997).

Diversos componentes estruturais das bactérias são adesinas não fímbricas. As bactérias Gram-positivas podem aderir às células animais através dos ácidos teicoicos e lipoteicoicos que são polímeros aniônicos ligados à face exterior da membrana citoplasmática da bactéria, respectivamente, por ligações covalentes ao peptidoglicano da parede celular ou através de uma cadeia lipídica (Navarre e Schneewind, 1999). O ácido lipoteicoico de *Strep. dysgalactiae* tem, provavelmente, um papel importante na sua adesão a células do epitélio mamário, tal como acontece com *Streptococci* do grupo A, em que foi demonstrada a utilidade do ácido lipoteicoico para a adesão a células animais (Calvinho *et al.*, 1998).

Muitas bactérias Gram-positivas utilizam proteínas de superfície ancoradas na parede celular para aderir à matriz extracelular ou a outros elementos presentes nas células do hospedeiro. As proteínas bacterianas que se ligam a componentes da matriz extracelular são designadas por *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMMs (Navarre e Schneewind, 1999), também referidas como *extracellular matrix binding proteins*, ECMBPs. Estas proteínas foram também denominadas por receptinas, embora não tenha

sido demonstrada claramente a função de activar um sinal intracelular como resultado da sua ligação ao respectivo receptor (Flock, 1999). Porém, outros autores sugerem a participação activa da célula após a bactéria desencadear o sinal para a internalizar (Calvinho *et al.*, 1998; Lammers *et al.*, 1999a; 1999b).

Diferentes microrganismos utilizam distintos mecanismos de adesão a células do epitélio mamário em cultura. Lammers e colaboradores (2001), num estudo sobre vários agentes etiológicos de mastite bovina, verificaram que *Staph. aureus* e *Strep. dysgalactiae* aderiram às células epiteliais através de moléculas de ligação à fibronectina, enquanto a adesão de *Strep. uberis* era independente desta proteína. Este agente etiológico, tal como *Strep. agalactiae* e *E. coli* apresentaram fraca aptidão para se ligar à fibronectina. Recentemente, Oliver e colaboradores (2005a) descreveram uma molécula em *Strep. uberis* – *Streptococcus uberis adhesion molecule* (SUAM) – e moléculas semelhantes em *Strep. agalactiae* e *Strep. dysgalactiae* que se ligam à lactoferrina e medeiam a adesão a células do epitélio mamário. Em *Staph. aureus*, recuperado de mastite clínica bovina, foi identificada uma proteína de ligação à fibronectina (Lindahl *et al.*, 1990). Também em estirpes de *Staph. caprae* isoladas a partir do leite de caprino foi detectada uma proteína de ligação à mesma proteína (Allignet *et al.*, 2001).

Proteínas associadas à membrana exterior da parede celular das bactérias Gram-negativas também são importantes para a sua ligação a células hospedeiras. Vilela (1993) identificou em *Mannheimia haemolytica* proteínas de ligação a células epiteliais de glândula mamária de ovino.

Quanto à estrutura que funciona como receptor na célula hospedeira, parece haver consenso sobre a hipótese de não existirem moléculas específicas da célula epitelial da glândula mamária para ligação entre os agentes invasores e estas células (Belkum *et al.*, 2002). Aparentemente, as bactérias têm maior afinidade para proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, a laminina ou o colagénio, do que para a face apical das células epiteliais (Cifrian *et al.*, 1994).

Algumas estirpes de *Staph. aureus* isoladas de infecções intramamárias em bovinos (Sutra e Poutrel, 1994) e estirpes de *Staphylococci* coagulase negativos também de origem mamária, nomeadamente *Staph. epidermidis*, *Staph.*

chromogenes e *Staph. hyicus*, apresentam aptidão para se ligar ao colagénio (Watts *et al.*, 1990).

Strep. dysgalactiae liga-se especificamente à vitronectina, sugerindo que esta proteína pode mediar a adesão às células epiteliais (Calvinho *et al.*, 1998). Porém, recentemente, foi também referida a ligação através da lactoferrina ligada à membrana celular (Oliver *et al.*, 2005a).

Lammers e colaboradores (1999a) verificaram que *Staph. aureus*, incubado em co-cultura com células alveolares de glândula mamária de bovino, aderiu em grande quantidade a células mioepiteliais, não tendo aderido a células do epitélio secretor. O inverso foi registado relativamente a *Strep. uberis*, e *Strep. dysgalactiae* exibiu capacidade para aderir a ambos os tipos de células.

A adesão de *Staph. aureus* a culturas de células mamárias ovinas pode ser mediada por zoogleia, um tipo de glicocálice (Aguilar *et al.*, 2001) e, segundo estes autores, será independente de proteínas na membrana celular.

O glicocálice bacteriano pode ser definido como qualquer componente externo à parede celular que contém polissacarídeos (Costerton *et al.*, 1981). Conforme a sua composição e estrutura, pode denominar-se por camada S, se for constituído por glicoproteínas e proteínas, por cápsula se se tratar de uma estrutura polissacarídica bem organizada que não é facilmente removida, ou zoogleia, a tradução da palavra inglesa *slime*, se a camada polissacarídica que envolve a parede celular da bactéria for difusa e facilmente destacável (Prescott *et al.*, 2002). Tanto nos sistemas naturais como em sistemas patogénicos, as bactérias crescem, geralmente, em microcolónias que se constituem à custa de glicocálice, que favorece a sua adesão tanto a superfícies inertes como a tecidos orgânicos (Costerton *et al.*, 1981). Numa primeira fase, a adesão a superfícies abióticas é, geralmente, mediada por interacções não específicas, sendo, no entanto, levada a cabo por moléculas específicas no caso da adesão a células. Após esta fase inicial, a produção de exopolissacarídeos pelas próprias bactérias leva à formação de um biofilme que consolida a adesão (Dunne, 2002).

A capacidade para produzir matriz exopolissacarídica é considerada o principal factor de virulência em *Staph. epidermidis*. Este é fundamentalmente importante

em estirpes causadoras de infecções secundárias ao implante de próteses, por estar associado com a colonização dos materiais que constituem estes dispositivos (Petrelli *et al.*, 2006). A produção de biofilme por *Staph. epidermidis* desenvolve-se supostamente em duas etapas. A adesão inicial é mediada por uma adesina polissacarídica capsular (*capsular polysaccharide adhesin*, PSA) e/ou uma ou várias proteínas de superfície. Posteriormente, é produzida uma adesina polissacarídica intercelular (*polysaccharide intercellular adhesin*, PIA), vulgarmente designada por *slime*, que agrega as bactérias entre si. Ambos os polissacarídeos são compostos principalmente por $\beta(1-6)$ -N-acetil-glucosamina (O’Gara e Humphreys, 2001; Maira-Litrán *et al.*, 2002). A adesina PIA é codificada pelo operão *ica* (*intercellular adhesin*), também referido como responsável pela produção da PSA (McKenney *et al.*, 1998). O operão é composto pelos genes *icaADBC* que codificam as quatro proteínas responsáveis pela produção e translocação através da membrana celular da adesina intercelular e pelo gene regulador *icaR*. O operão *ica* está também presente em estirpes de *Staph. aureus* e é responsável pela produção de biofilme nesta espécie (Cramton *et al.*, 1999; Vasudevan *et al.*, 2003; Cucarella *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, foi descrita uma proteína de superfície envolvida na formação de biofilme, designada por *biofilm associated protein*, Bap, que promove a adesão inicial a materiais abióticos e a adesão intercelular das bactérias, por aumentar a acumulação da adesina PIA (Cucarella *et al.*, 2001). Em estirpes de *Staph. aureus* com o gene *bap*, que codifica esta proteína, às quais foi delectado o operão *ica*, a expressão da proteína Bap foi suficiente para induzir a produção de biofilme *in vitro* (Cucarella *et al.*, 2004).

A proteína Bap foi identificada em 10% de isolados de *Staphylococci* coagulase negativos provenientes de mastite bovina, incluindo *Staph. epidermidis*, *Staph. chromogenes*, *Staph. hyicus* e *Staph. xylosus*, tendo sido confirmada a sua presença em 5% de SCN e 25,6% de estirpes de *Staph. aureus* também provenientes de mastite em bovinos (Cucarella *et al.*, 2001; 2004).

O efeito da produção de exopolissacarídeo sobre a capacidade de adesão das bactérias a células eucarióticas tem sido referido por diversos autores de forma contraditória. Alguns estudos revelaram que a produção de zooglia diminui a

capacidade de aderir à fibronectina e ao fibrinogénio em *Staph. aureus* (Cucarella *et al.*, 2002) e em *Staph. epidermidis* (Baldassarri *et al.*, 1997). No entanto, num ensaio experimental, estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de exopolissacarídeo revelaram melhor capacidade para colonizar a glândula mamária de ovelhas do que estirpes não produtoras (Baselga *et al.*, 1993). Noutro estudo, estirpes de *Staph. aureus*, isoladas a partir do leite de ovelhas e de vacas com mastite, após incubação com zoogleia, revelaram, de forma significativa, maior capacidade para aderir a culturas primárias de células do epitélio mamário ovino, do que os mesmos microrganismos sem este tratamento prévio. As mesmas estirpes, depois de tratadas com exopolissacarídeo, quando incubadas com anticorpos específicos para o exopolissacarídeo, apresentaram uma taxa de adesão significativamente menor do que as que não foram sujeitas à acção dos anticorpos (Aguilar *et al.*, 2001).

Invasão

A capacidade invasora de um microrganismo está na estreita dependência da produção de enzimas que destroem componentes orgânicos, facilitando a dispersão e passagem dos agentes patogénicos aos tecidos/células adjacentes. Como factores de virulência envolvidos na capacidade invasora podemos citar a colagenase que degrada o colagénio, a desoxiribonuclease (DNase), que diminui a viscosidade dos exsudados ou a hialuronidase, que hidrolisa o ácido hialurónico. Este enzima é produzido por *Strep. agalactiae* (Radostits *et al.*, 2000), *Strep. dysgalactiae* (Calvinho *et al.*, 1998) e *Strep. uberis* (Oliver *et al.*, 1998) e revelou inibir a proliferação de células epiteliais de glândula mamária em cultura (Matthews *et al.*, 1994).

As fibrinolisinases, estreptoquinase e estafiloquinase, activam o plasminogénio que se converte em plasmina. Esta protease hidrolisa a fibrina e induz a destruição de proteínas da matriz extracelular, facilitando o movimento dos microrganismos anteriormente circunscritos. Foram identificadas em *Strep. uberis* e *Strep. dysgalactiae* diferentes estreptoquinases (Leigh, 1993; Leigh *et al.*, 1998).

Estirpes bovinas de *Staph. aureus* são estafiloquinase negativas. No entanto, a estirpe de referência *Staph. aureus* M60, isolada de mastite bovina, tem a

capacidade de estimular a produção, pelas células mamárias, do activador de plasminogénio uroquinase (Zavizion *et al.*, 1997). Os mesmos autores verificaram *in vitro* que, na presença de plasminogénio de origem bovina, as bactérias transpõem as células com maior eficiência, sugerindo que este mecanismo é importante para a disseminação dos agentes patogénicos na glândula mamária. Em glândulas mamárias de ovelha infectadas com *Staphylococci* coagulase negativos, a quantidade de activador do plasminogénio e a actividade da plasmina estão muito elevadas relativamente a glândulas não infectadas (Leitner *et al.*, 2004).

Muitas bactérias têm a capacidade de invadir e sobreviver dentro de células eucarióticas, incluindo células não fagocitárias como as células epiteliais e as células endoteliais. Algumas espécies de bactérias produzem enzimas que lhes permitem uma entrada forçada dentro da célula, após aderirem à sua superfície. Porém este mecanismo processa-se, geralmente, após a adesão a moléculas chamadas invasinas, o que desencadeia o sinal para a célula interiorizar a bactéria, formando-se um vacúolo que a contém, no citoplasma da célula (Finlay e Falkow, 1997). A invasão de células permite transpor as barreiras epiteliais dos animais, além de fornecer aos microrganismos um local para permanecerem no hospedeiro, escapando aos seus mecanismos de defesa e aos agentes antimicrobianos utilizados para tratamento.

A internalização de agentes etiológicos de mastite por parte das células que constituem o epitélio mamário é, provavelmente, um factor importante para a manutenção de infecções crónicas. Hébert e colaboradores (2000) demonstraram a presença de *Staphylococcus aureus* viáveis dentro de células alveolares e de macrófagos eliminadas com o leite de vacas com mastite crónica. Almeida e colaboradores (2005) verificaram, *in vitro*, que *Staph. aureus* pode permanecer no interior da célula epitelial de glândula mamária durante um período de 72 horas, após o qual a célula é destruída, mas *Strep. uberis* pode permanecer em situação intracelular 120 horas sem danificar a célula.

A capacidade para invadir células mamárias foi evidenciada em diversos estudos *in vitro* que envolveram isolados de *Staph. aureus* (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Hensen *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005),

estafilococos coagulase negativos (Almeida e Oliver, 2001), *Strep. dysgalactiae* (Almeida e Oliver, 1995; Calvinho *et al.*, 1998), *Strep. uberis* (Oliver *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2005), *Escherichia coli* (Dopfer *et al.*, 2000; Dopfer *et al.*, 2001; Dogan *et al.*, 2005) e *Mannheimia haemolytica* (Vilela, 1993). Aparentemente a invasão celular processa-se com participação activa da célula alvo, após a bactéria desencadear o sinal para a célula a internalizar (Calvinho *et al.*, 1998; Lammers *et al.*, 1999a). Vários autores referem a observação de pseudópodes emitidos pela célula epitelial, formando-se um vacúolo que transporta as bactérias para o interior do citoplasma da célula (Almeida e Oliver, 1995; Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Almeida e Oliver, 2001). Trabalhos recentes de Almeida e Oliver (2005) referem um mecanismo de endocitose relativamente a *Strep. uberis* que permite à bactéria maior sobrevivência intracelular.

Foi referido que a invasão, por *Staph. aureus*, de células mamárias de bovino em cultura depende da existência de proteína de ligação à fibronectina na superfície da bactéria (Lammers *et al.*, 1999b). No entanto, um estudo *in vivo* efectuado em fêmeas de rato revelou que uma estirpe mutante deste agente patogénico, que não possui moléculas de ligação à fibronectina, tem capacidade para produzir infecção intracelular do epitélio mamário (Brouillette *et al.*, 2003).

Resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro

Diversas formas de ultrapassar os mecanismos de defesa do organismo hospedeiro são levadas a cabo pelos diferentes microrganismos. O próprio glicocálice, além de interferir sobre a capacidade de adesão dos microrganismos às células eucarióticas, oferece protecção contra alguns mecanismos de defesa do hospedeiro. A cápsula polissacarídica ou a zooglia impedem a activação do complemento e a fagocitose e, como são pouco imunogénicas, exercem uma fraca estimulação da resposta imunológica específica.

Algumas estirpes de *Staph. aureus* causadoras de mastite em ruminantes possuem uma cápsula polissacarídica que protege as bactérias da fagocitose. Embora não impeça a ligação de opsoninas, imunoglobulinas e fracção C3b do complemento, aos receptores na sua superfície, impede a ligação das opsoninas aos respectivos receptores nas células fagocitárias (Baselga *et al.*, 1994).

A aptidão para produzir zoogleia por estirpes de *Staph. aureus* causadoras de mastite é frequente (Baselga *et al.*, 1993). Vasudevan e colaboradores (2003) identificaram a presença do operão responsável pela produção deste exopolissacarídeo em todos os 35 isolados estudados e Cucarella e co-autores (2004) em 94,36% de 195 isolados. A expressão dos respectivos genes é influenciada pelo meio ambiente (Gotz, 2002) e, como tal, pelo meio de cultura utilizado nos estudos *in vitro*. Assim, a pesquisa de estirpes positivas com base em caracteres fenotípicos pode não representar a real incidência de estirpes produtoras de biofilme. Porém, após crescimento em meios de cultura que favorecem a acumulação de exopolissacarídeo, *Staph. aureus* torna-se menos susceptível à fagocitose e fixa com menor eficiência a fracção C3b do complemento do que depois de crescer noutros meios de cultura (Baselga *et al.*, 1994). Num ensaio *in vitro*, utilizando polimorfonucleares neutrófilos sanguíneos de bovino, verificou-se uma diminuição da fagocitose e da acção bactericida face a uma estirpe de *Staph. aureus* produtora de zoogleia relativamente à sua variante não produtora de exopolissacarídeo (Barrio *et al.*, 2000).

As espécies de *Staphylococci* que têm capacidade para produzir zoogleia formam uma matrix exopolissacarídica que, juntamente com as próprias células bacterianas, constitui um biofilme. Neste biofilme a bactéria, sob a forma séssil, consegue protecção contra os mecanismos de defesa celulares e humorais e maior resistência aos agentes antimicrobianos utilizados para o seu tratamento. De entre os isolados de *Staph. aureus* provenientes de casos de mastite bovina, os que exibem maior capacidade para produzir biofilme são menos susceptíveis à acção bactericida de antibióticos do que as estirpes menos produtoras ou não produtoras (Cucarella *et al.*, 2004). Como a expressão dos genes para a produção de exopolissacarídeos é influenciada por vários factores ambientais, surgem variações fenotípicas de estirpes portadoras do operão *ica* incapazes de produzir biofilme. Esta variação de fase permite a bactérias incluídas no biofilme adquirir uma forma planctónica e, assim, invadir outros locais no organismo hospedeiro. Desta forma, as bactérias que constituem um nicho de cronicidade podem ressurgir num surto de afecção aguda.

Frequentemente, estirpes de *Staph. aureus* com elevada capacidade para formar biofilme não induzem uma descarga celular no leite superior a 200 000 células/mL de leite (Cucarella *et al.*, 2004), possivelmente por, à semelhança do que acontece face à resposta imunológica específica, estimularem fracamente a resposta não específica. Este aspecto é particularmente importante não só porque condiciona a evolução da doença, mas também interfere com o diagnóstico. Visto que os programas de controlo de mastite se baseiam geralmente nos valores das contagens de células somáticas, para detecção de animais positivos, aqueles animais serão assumidos como livres de infecção intramamária, e não serão tomadas as medidas de maneio adequadas para impedir a disseminação dos microrganismos. Como tal, a elaboração de biofilme por agentes etiológicos de mastite, além de promover a sobrevivência dos microrganismos na glândula mamária, facilita a persistência do agente patogénico no efectivo animal.

A capacidade de produzir zoogleia por isolados de *Staph. epidermidis* causadores de mastite em ruminantes é frequentemente pesquisada numa tentativa de explicar a sua implicação na patologia desta afecção (Wats *et al.*, 1990; Saa e Kruze, 1995; Bedidi-Madani *et al.*, 1998). A percentagem de isolados produtores varia consideravelmente nos diferentes estudos (6% a 43%).

Outras espécies de SCN isoladas a partir de leite de animais com mastite podem produzir zoogleia, designadamente *Staph. caprae*, *Staph. chromogenes*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. hyicus*, *Staph. simulans*, *Staph. warneri* e *Staph. xylosus* (Wats *et al.*, 1990; Saa e Kruze, 1995; Bedidi-Madani *et al.*, 1998). Em estirpes de *Staph. caprae* isoladas de leite de cabra foi identificado um operão *ica* e um gene regulador *icaR* semelhantes aos presentes em *Staph. epidermidis* ($\geq 68\%$ de semelhança) e os polipeptídeos resultantes exibem 67 a 88% dos aminoácidos que constituem as proteínas responsáveis pela produção da matriz exopolissacarídica nesta espécie (Allignet *et al.*, 2001).

Relativamente a *Streptococci*, algumas espécies causadoras de mastite possuem uma cápsula rica em ácido hialurónico quimicamente semelhante ao do tecido conjuntivo animal e, portanto, não reconhecida como não-própria pelo sistema imunológico do animal. Estirpes encapsuladas de *Streptococcus uberis* não induzem tão eficazmente a fagocitose como as não capsuladas (Almeida e Oliver,

1993). Foi, no entanto, sugerido por outros autores que esta capacidade de *Strep. uberis* resistir à fagocitose por parte de neutrófilos se deve a moléculas libertadas pela bactéria no meio circundante e não pela própria cápsula (Field *et al.*, 2003; Leigh *et al.*, 2004).

Além do glicocálice, outras estruturas bacterianas podem contrariar a acção dos mecanismos de defesa do animal. Existem proteínas de superfície em alguns microrganismos que impedem a actividade do complemento e a fagocitose. A proteína A, presente em 50-60% de estirpes de *Staph. aureus* isoladas de infecções intramamárias em bovinos (Sutra e Poutrel, 1994) liga-se à fracção Fc da IgG, impedindo a opsonização e, conseqüentemente prejudicando a fagocitose e a activação do complemento. Num estudo sobre variações do locus *agr* (*accessory gene regulator*), que regula a expressão de proteína A, em *Staph. aureus* isolados a partir do leite de vacas com mastite clínica e subclínica, 43,4% das estirpes analisadas produziram quantidades elevadas de proteína A (Takeuchi *et al.*, 2001).

A proteína M que faz parte das fímbrias dos estreptococos do grupo A liga-se ao fibrinogénio do soro, bloqueando a ligação do complemento ao peptidoglucano, prejudicando também a fagocitose. O componente de ligação ao fibrinogénio de *Strep. dysgalactiae* pode representar um factor de virulência semelhante à proteína M. Este agente de mastite possui ainda uma proteína tipo-M (*M-like*) que é reconhecida por anticorpos específicos para a proteína M24 de *Strep. pyogenes* (Calvinho *et al.*, 1998). Vasi e colaboradores (2000) caracterizaram e identificaram os genes responsáveis por três proteínas tipo-M associadas à parede deste microrganismo com capacidade para se ligarem ao fibrinogénio ou à IgG ou a ambos. Foi descrita uma outra proteína expressa à superfície de *Strep. dysgalactiae* com capacidade para se ligar à fracção Fc da IgG e à glicoproteína plasmática α_2 -macroglobulina, que inibe a fagocitose e a acção bactericida de polimorfonucleares neutrófilos bovinos (Song *et al.*, 2001). Ainda a ligação de *Strep. dysgalactiae* à vitronectina inibe a fixação da fracção C3b do complemento e a subsequente fagocitose pelos PMN (Calvinho *et al.*, 1998).

Outra forma de ultrapassar as defesas do hospedeiro consiste na capacidade dos microrganismos, após serem fagocitados, resistirem a este mecanismo. Algumas

bactérias são capazes de se evadir do fagossoma, antes de este se fundir com o lisosoma, ficando livres no citoplasma da célula hospedeira, outras conseguem impedir esta fusão, e outras, ainda, após a formação do fagolisosoma, resistem aos enzimas lisosómicos aí libertados. Foram recuperadas bactérias viáveis fagocitadas por macrófagos, a partir do leite de vacas com mastite crónica causada por *Staph. aureus* (Hébert *et al.*, 2000).

Algumas bactérias que podem estar associadas à patologia da glândula mamária, como *Staph. aureus*, produzem enzimas que lhes permitem ultrapassar mecanismos de defesa do organismo animal. O enzima coagulase coagula o fibrinogénio do plasma, formando coágulos de fibrina que protegem os microrganismos da fagocitose e os isolam de outros factores de defesa celulares e solúveis. Recentemente foi referida a acção da DNase que destrói redes extracelulares de DNA e proteínas produzidas por neutrófilos para aprisionar e lisar bactérias (Brinkmann *et al.*, 2004).

Outros enzimas produzidos por microrganismos podem ser considerados factores de virulência porque danificam as “armas” de defesa do hospedeiro. Várias bactérias patogénicas produzem proteases capazes de clivar imunoglobulinas. Algumas estirpes de SCN isoladas de mastite subclínica em caprinos (Bedidi-Madani *et al.*, 1998) e de infecção intramamária em bovinos (Watts *et al.*, 1990) são produtoras de elastase, um enzima que revelou a capacidade de degradar IgA e IgM, quando produzido por *Staph. epidermidis* (Sloot *et al.*, 1992).

O enzima lecitinase é uma fosfolipase que remove as cabeças polares dos fosfolípidos, desestabilizando a membrana citoplasmática e provocando a lise das células. Esta acção sobre células fagocitárias ou outras envolvidas na defesa do organismo hospedeiro pode ter influência na resistência a mastites. Num estudo que incidiu sobre 450 isolados de SCN, verificou-se que os isolados de leite de vacas com mastite subclínica apresentaram maior actividade lecitínica do que outras estirpes de SCN (Karadzhov *et al.*, 1981).

Produção de toxinas

O poder patogénico de um agente etiológico é grandemente influenciado pela sua toxigenicidade, ou capacidade de produzir toxinas. Toxinas são substâncias que alteram o metabolismo normal das células com efeitos nefastos para o hospedeiro. O papel das toxinas microbianas como factores de virulência relevantes na patogénese das infecções intramamárias é bem evidenciado ao verificar-se que a administração de toxoides reduz a frequência e gravidade de mastites clínicas (Sutra e Poutrel, 1994). As toxinas produzidas por bactérias são de duas categorias, endotoxinas e exotoxinas.

A endotoxina corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS) que constitui a membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas. O componente tóxico do LPS é o lípido A. Todas as bactérias Gram-negativas libertam endotoxina quando sujeitas a lise e, também, em pequenas quantidades, durante o seu crescimento. A endotoxina produzida por diferentes géneros de bactérias Gram-negativas é semelhante. Além desta característica, outras propriedades distinguem a endotoxina das exotoxinas. A endotoxina é tóxica em doses mais elevadas, na ordem das mg/kg, é termorresistente, é pouco imunogénica e, geralmente, induz sintomatologia sistémica no hospedeiro, em resultado duma acção indirecta mediada pelo próprio organismo hospedeiro. Estimulados pela endotoxina, os macrófagos libertam a citocina TNF- α que actua sobre as células endoteliais estimulando a expressão de integrinas e a libertação, por estas células, de IL-6 (Tizard, 2004). É activado o Factor Hageman que desencadeia uma reacção em cascata com resultante coagulação intra-vascular, hemorragias internas, inflamação, hipotensão ou mesmo choque séptico. Os pirogénios endógenos IL-1 e TNF- α , libertados pelos macrófagos, actuam sobre o centro hipotalâmico da termorregulação originando a febre. Outras citocinas são libertadas pelos macrófagos, monócitos e outras células, quando complexos de LPS ligado a proteínas plasmáticas especiais (LPB - *LPS-binding proteins*) se ligam a receptores na sua superfície, desencadeando outros mecanismos como activação do complemento, formação de prostaglandinas e coagulação.

Ao nível da glândula mamária, a endotoxina é responsável por alterações patogénicas designadamente aumento da permeabilidade vascular e edema local

(Shuster *et al.*, 1991a; 1993). Inoculada em células do epitélio mamário em cultura, a endotoxina inibe a proliferação celular (Matthews *et al.*, 1994).

Em diversos trabalhos experimentais, através da inoculação de endotoxina na glândula mamária bovina, foi possível verificar que esta toxina induziu sintomatologia geral semelhante à que ocorre nas mastites por *E. coli* (Shuster *et al.*, 1991a; 1993; Welles *et al.*, 1993) e provocou hipogalactogénese de uma forma sistémica, visto que a redução da produção de leite, nos animais em experiência, se verificou também nos quartos mamários não inoculados (Shuster *et al.*, 1991b).

Alguns dos sintomas desenvolvidos durante uma mastite endotóxica, nomeadamente reacção sistémica e influxo local de PMNs, são atribuídos à acção de citocinas produzidas na glândula mamária por indução da endotoxina, especificamente TNF, IL-1 e IL-6 (Shuster *et al.*, 1993; 1995).

As exotoxinas são proteínas que podem ser produzidas tanto por bactérias Gram-positivas como por Gram-negativas. São libertadas no meio onde a bactéria cresce e atingem células ou tecidos onde exercem o seu efeito. São sintetizadas por agentes patogénicos, dependendo de informação genética, a qual muitas vezes está contida em plasmídios ou profagos, e produzem efeitos patogénicos característicos através de mecanismos de acção próprios e que diferem de toxina para toxina. Ao contrário das endotoxinas, as exotoxinas são termolábeis, sendo inactivadas a temperaturas entre os 60°C e os 80°C, muito imunogénicas, tóxicas em doses muito baixas, na ordem das µg/kg e, geralmente, não induzem febre no hospedeiro.

Muitas exotoxinas produzidas por bactérias patogénicas têm uma estrutura designada por "AB", são compostas por uma fracção enzimática, o fragmento A, que é responsável pelo efeito tóxico, depois de estar dentro da célula hospedeira, e uma fracção de ligação à célula, o fragmento B, sem o qual, o fragmento A não é capaz de invadir a célula hospedeira.

Algumas exotoxinas afectam tecidos específicos do organismo hospedeiro, sendo denominadas de acordo com o tipo de célula alvo. Assim, as neurotoxinas têm

afinidade para o tecido nervoso, as enterotoxinas actuam sobre o epitélio intestinal e as citotoxinas podem incidir sobre células de vários tecidos.

São citotoxinas as já referidas fosfolipases, as diversas hemolisinas produzidas por diferentes microrganismos e a leucocidina produzida pelo *Staph. aureus*. Estas toxinas produzem poros na membrana celular dos eritrócitos, dos leucócitos e de outras células do organismo do animal levando à sua lise. Além de destruir células importantes na defesa do hospedeiro, libertam ferro e nutrientes que são utilizados pelos microrganismos como factores de crescimento.

A α -hemolisina é produzida por uma percentagem variável de estirpes de *Staph. aureus* isoladas de infecções intramamárias bovinas, que pode chegar a 100% dos isoladas (Haveri *et al.*, 2005a). Esta toxina promove o crescimento bacteriano na glândula mamária (Sutra e Poutrel, 1994) e inibe a proliferação de células do epitélio mamário em cultura (Matthews *et al.*, 1994). As células mamárias em cultura, após incubação com esta toxina, ficam danificadas, facilitando a adesão de *Staph. aureus* (Cifrian *et al.*, 1994). A β -hemolisina é produzida por 75 a 100% de estirpes de *Staph. aureus* de origem mamária em bovinos (Sutra e Poutrel, 1994). A β -hemolisina estafilocócica provoca danos menos acentuados do que a α -hemolisina nas células mamárias *in vitro*, mas potencia o efeito tóxico desta última e favorece a proliferação e a capacidade de adesão da bactéria (Cifrian *et al.*, 1996). Várias isolados de SCN, originários de leite de cabras com mastite subclínica, revelaram ser produtores de α -hemolisina, β -hemolisina e δ -hemolisina (Bedidi-Madani *et al.*, 1998).

Uma leucotoxina produzida por estirpes de *Staph. aureus* isolados a partir do leite de vacas, ovelhas e cabras com mastite revelou ter a capacidade de danificar células polimorfonucleares de bovino, de ovino e de caprino *in vitro* (Rainard *et al.*, 2003).

Zhang e Maddox (2000) identificaram uma nova metaloproteína produzida por SCN isolados a partir de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, que revelou ser citotóxica para várias linhas de células animais, além de ter a capacidade de hidrolisar a caseína.

Um grupo de exotoxinas, os superantigénios ou toxinas pirogénicas superantigénicas (*pyrogenic toxin superantigens*, PTSAgs) possuem em comum três efeitos biológicos: têm efeito de superantigénio, são pirogénicas e são capazes de potenciar o efeito letal da endotoxina em coelhos até 100 000 vezes. Pertencem a este grupo as toxinas pirogénicas estreptocócicas (SPE) e os superantigénios estreptocócicos, a toxina do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SE) (Dinges *et al.*, 2000). Estas são toxinas eméticas e causam toxinfecção alimentar estafilocócica nos humanos, das quais, cinco estão bem caracterizadas, a enterotoxina A (SEA), a enterotoxina B (SEB), a enterotoxina C (SEC), a enterotoxina D (SED) e a enterotoxina E (SEE), tendo sido já descritas as enterotoxinas SEG a SER (Orwin *et al.*, 2001; Omoe *et al.*, 2003).

Superantigénios são moléculas de origem microbiana que têm a capacidade de se ligar de uma forma inespecífica a todos os receptores de antígeno de linfócitos T que tenham um determinado domínio V β . Desta forma, cerca de 20% de todos os linfócitos T do animal são estimulados, em vez de menos de 1 em cada 10 000, como acontece quando só as células com receptores específicos para determinado antígeno são activadas. A resposta a esta superestimulação pode ser a tolerância ao antígeno ou a secreção de grandes quantidades de citocinas produzindo o síndrome do choque tóxico (Tizard, 2004). Esta condição caracteriza-se por febre, hipotensão, falência de vários órgãos e, frequentemente, a morte. A capacidade de potenciar o efeito letal da endotoxina pode dever-se à diminuição da capacidade detoxificadora do fígado subsequente a um efeito citotóxico sobre as células hepáticas, que pode ser causado directamente pela PTSAg (Dinges *et al.*, 2000) ou pela citocina TNF- α produzida pelos macrófagos, depois de estimulados pelas toxinas. A fraca imunidade obtida face às toxinas e à própria bactéria é, provavelmente, consequente da tolerância imunitária, por falência dos linfócitos T (McCormick *et al.*, 2001).

Os genes que codificam para PTSAgs estão frequentemente associados em ilhas de patogenicidade (Fitzgerald *et al.*, 2001; Yarwood *et al.*, 2002), as quais são extensões genómicas móveis, de tamanho entre 10 e 200 Kb, que compreendem genes para factores de virulência e *loci* de mobilidade. Estas ilhas estão

presentes no genoma de estirpes patogénicas, mas ausentes nas estirpes não patogénicas da mesma espécie (Hacker e Kaper, 2000; Schmidt e Hensel, 2004).

A intoxicação do hospedeiro com exotoxinas microbianas pode efectuar-se por três vias distintas. As toxinas podem ser ingeridas pré-formadas, juntamente com alimentos contaminados com as bactérias produtoras, podem ser produzidas ao nível de uma mucosa colonizada com um agente toxigénico, onde podem actuar sobre as células que constituem o epitélio, ou a partir daí atingir a corrente sanguínea, ou, ainda, podem ser produzidas por microrganismos envolvidos numa infecção interna, produzindo efeitos locais e/ou à distância.

A produção de enterotoxinas e TSST-1 por estafilococos isolados a partir de leite de ruminantes com mastite está bem documentada. Do leite mastítico de bovino foram isoladas estirpes de *Staph. aureus* produtoras de várias enterotoxinas e TSST-1 (Orden *et al.*, 1992b; Fitzgerald *et al.*, 2000; Zschöck *et al.*, 2000; Akineden *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003; Suk-kyung *et al.*, 2004; Haveri *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2005; Zecconi *et al.*, 2006). Estirpes produtoras foram isoladas de casos de mastite clínica e também de mastite subclínica (Kuroishi *et al.*, 2003; Haveri *et al.*, 2005a). Estafilococos coagulase negativos de origem bovina revelaram também a capacidade de produzir estas toxinas (Orden *et al.*, 1992c; Kuroishi *et al.*, 2003).

Têm sido também isoladas estirpes de *Staph. aureus* com competência para produzir enterotoxinas e TSST-1 a partir do leite de ovelhas com mastite (Hájek e Maršálek, 1973; Hájek, 1978; Otero *et al.*, 1987; Bautista *et al.*, 1988; Orden *et al.*, 1992a; 1992b; De Santis *et al.*, 2005a) e de cabras afectadas (Orden *et al.*, 1992b; Silva *et al.*, 2005). Também foi descrito o isolamento de estirpes de SCN produtoras de enterotoxinas e de TSST-1 de origem mamária em ovinos (Bautista *et al.*, 1988; Orden *et al.*, 1992a; 1992c) e caprinos (Orden *et al.*, 1992c).

As estirpes de *Staph. aureus* causadoras de mastite em ovelhas e cabras produzem uma toxina com a designação de TSST-O. Como tem o mesmo peso molecular e reage com anticorpos específicos para TSST-1, foi anteriormente identificada como TSST-1 com base em reacções de imunodifusão. A TSST-O difere da TSST-1 em 7 dos seus 194 aminoácidos, tem um ponto isoeléctrico

diferente, é fracamente mitogénica, não é pirogénica, e não tem capacidade de potenciar o efeito da endotoxina (Ho *et al.*, 1989).

Na bibliografia consultada verifica-se a frequente produção conjunta de enterotoxina C e TSST-1 tanto por *Staph. aureus* (Orden *et al.*, 1992a; Fitzgerald *et al.*, 2000; Zschöck *et al.*, 2000; Akineden *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003; De Santis *et al.*, 2005a; Haveri *et al.*, 2005a; Jørgensen *et al.*, 2005) como por SCN (Orden *et al.*, 1992c; Kuroishi *et al.*, 2003). Esta característica poderá dever-se ao facto de os genes que codificam estas duas toxinas estarem situados numa mesma ilha de patogenicidade (Fitzgerald *et al.*, 2001).

Relativamente à influência da produção de superantigénios sobre a patologia da glândula mamária de ruminantes, a inoculação experimental na glândula mamária de bovino de uma estirpe de *Staph. aureus* contendo o gene para a produção de SEC não induziu aumento linfocitário nem reacção inflamatória significativamente diferente da apresentada por animais inoculados com uma estirpe do mesmo agente sem o gene para esta toxina (Ebling *et al.*, 2001). No entanto, num outro ensaio também em bovinos, a instilação intramamária da enterotoxina C produziu um aumento da descarga de células somáticas significativamente superior à descarga apresentada por glândulas inoculadas com PBS. No mesmo estudo, a reacção à inoculação de TSST-1 não apresentou diferenças significativas face ao controlo negativo (Kuroishi *et al.*, 2003). Haveri e colaboradores (2005a) sugerem que o quadro sintomatológico de mastite bovina, causada por diferentes estirpes de *Staph. aureus*, difere conforme a capacidade destas bactérias para produzir toxinas.

1.5 – MECANISMOS DE DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária saudável é estéril. Ao contrário de outras mucosas, a mucosa mamária não possui microbiota residente, pelo que, a falta de estimulação por parte daqueles microrganismos será uma das razões que justificam a fraca imunidade deste órgão (Rainard e Poutrel, 1993). Além disso, os factores de protecção que geralmente a flora normal oferece às mucosas que coloniza, estão ausentes na glândula mamária.

A defesa da glândula mamária face a microrganismos patogénicos depende de um conjunto de mecanismos que inclui factores de resistência inata, protagonizada pela barreira física do canal do teto, macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos *natural killer* (NK) e factores solúveis, além de uma resposta imunológica adaptativa, mediada por linfócitos e moléculas de anticorpos.

Barreira física

O canal do teto ou *ductus papillaris* funciona como primeira linha de defesa contra agentes estranhos. A solução de continuidade entre a glândula mamária e o exterior é conseguida graças à musculatura em forma de esfíncter que envolve o *ductus papillaris* e à camada de queratina que o forra internamente. Esta queratina, produzida pelas células que constituem o epitélio escamoso estratificado do canal, forma um verdadeiro tampão que além de barreira física, possui propriedades antimicrobianas (Capuco *et al.*, 1992). A descamação celular e o efeito mecânico do fluxo de leite também são factores físicos importantes para prevenir o acesso de microrganismos à glândula mamária.

Células fagocitárias

As células fagocitárias presentes na secreção mamária são responsáveis pela segunda linha de defesa face a agentes causadores de mastite. Já em 1908, Elie Metchnikoff, na sua dissertação quando recebeu o prémio Nobel da Fisiologia e da Medicina, por ter descoberto a fagocitose em 1883, citou o trabalho de um

veterinário suíço, Zschokke que refere a fagocitose de estreptococos durante a mastite infecciosa em vacas (Kehrli e Harp, 2001). As células fagocitárias conferem a chamada vigilância imunitária (*immune surveillance*) (Paape *et al.*, 2000), assumindo um papel fundamental para a defesa da glândula mamária, apesar de a sua actividade ser altamente prejudicada pela presença de caseína e glóbulos de gordura, que são fagocitados, provocando danos nos fagócitos cuja actividade microbicida fica diminuída. Na glândula saudável, os macrófagos são o principal fagócito mas, após a infecção, dá-se o recrutamento de PMNs que podem atingir cerca de 90% dos leucócitos presentes. Além da sua actividade fagocítica, os neutrófilos produzem defensinas, que são péptidos com propriedades antibacterianas (Selsted *et al.*, 1993) e proteínas também bactericidas que libertam no meio circundante. Nos bovinos, pelo menos 13 β -defensinas diferentes são produzidas pelos neutrófilos (Tizard, 2004) e também foram já identificados genes para a produção destes péptidos no DNA de células do epitélio mamário (Oliver *et al.*, 2005b). Recentemente foi descrita a produção por neutrófilos activados de *neutrophil extracellular traps* (NETs). Estas são fibras extracelulares constituídas por cromatina e proteínas, que aprisionam e lisam bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que não foram fagocitadas (Brinkmann *et al.*, 2004).

Os leucócitos possuem receptores, designados por *pattern recognition receptors* (PRRs) ou *Toll-like receptors* (TLRs), que reconhecem estruturas relativamente constantes na superfície dos agentes patogénicos, como o LPS, o peptidoglicano, ácidos lipoproteicos ou lipoproteínas bacterianas. Estas estruturas são designadas por *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Os TLRs são responsáveis pelo chamado reconhecimento imunitário inato e permitem ao hospedeiro detectar a presença de infecção, induzindo a activação da inflamação e de factores antimicrobianos não específicos (Medzhitov, 2001). O conceito actual de defesa inata não é equivalente a defesa não específica, visto que apresenta especificidade molecular (Vivier e Malissen, 2005).

Ao nível da glândula mamária, os PRRs são responsáveis pela activação de factores inflamatórios importantes para se criar um gradiente quimiotáctico que começa nas vénulas pós-capilares da glândula mamária e aumenta em direcção

ao local da infecção (Kehrl e Harp, 2001). Neste processo, estão também envolvidas moléculas acessórias, designadamente a LBP e o CD14 que, provavelmente, têm um papel importante na defesa inata da glândula mamária (Rainard e Riollet, 2006). Os vários factores inflamatórios induzem a expressão e activação de moléculas de adesão e ligandos nas células endoteliais e nos PMNs que, por último, resulta na leucodiapedese. Estes neutrófilos que se acumulam em grande quantidade na glândula mamária são os principais efectores na batalha entre o hospedeiro e os agentes patogénicos (Burton e Erskine, 2003).

Linfócitos NK

Além das células fagocitárias, foram isoladas da glândula mamária de bovino células linfóides NK que exibem actividade antibacteriana. Quando estimuladas com a citoquina IL-2, estas células aumentam a sua capacidade para lisar *Staphylococcus aureus* de uma forma não específica (Sordillo *et al.*, 1991).

Factores solúveis não específicos

Vários factores solúveis estão envolvidos na resistência não específica da glândula mamária. Estes factores incluem o complemento, as proteínas lactoferrina e transferrina, a lisozima, o sistema lactoperoxidase-tiocianato-peróxido de hidrogénio, o enzima xantina oxidase, anticorpos naturais e algumas citoquinas.

O sistema do complemento é composto por um conjunto de proteínas séricas que, quando estimulado, desenvolve uma reacção em cascata de que resultam factores inflamatórios, factores quimiotácticos, opsoninas e um complexo de ataque membranário capaz de lisar células e bactérias Gram-negativas. O complemento tem um papel importante na defesa inata da glândula mamária através das suas acções bactericida, opsónica e flogística (Rainard, 2003). O fragmento C5a, apesar de existir em pequenas quantidades no leite saudável, tem sido apontado como factor quimiotáctico para os neutrófilos, durante um processo infeccioso da glândula mamária (Shuster *et al.*, 1997; Riollet *et al.*, 2000; Rainard, 2003). O desencadeamento da resposta inflamatória por acção do C5a pode depender da presença de receptores para esta proteína na face apical das células

epiteliais mamárias, embora não tenha sido demonstrada a expressão destes receptores nas células do epitélio mamário (Rainard e Riollot, 2006).

Duas proteínas com capacidade para fixar o ferro são relevantes na protecção não específica da glândula mamária: a lactoferrina e a transferrina. A lactoferrina é produzida na glândula mamária pelas células epiteliais e, em menor, quantidade pelos neutrófilos, e a transferrina é transportada a partir do sangue. A concentração de lactoferrina, normalmente em baixa, aumenta durante a involução da glândula e no decurso da inflamação. Em resposta à invasão bacteriana, os neutrófilos libertam as suas reservas de lactoferrina (Tizard, 2004). No colostro de ovelha, as duas proteínas existem em quantidades semelhantes, pelo que se supõe que têm importância de grandeza semelhante na protecção da glândula mamária (Sanchez *et al.*, 1992). Estas proteínas são bacteriostáticas por privarem as bactérias do ferro que necessitam para crescer, tornando-as também mais susceptíveis à destruição por células fagocitárias (Sordillo *et al.*, 1997).

A proteína bactericida lisozima hidrolisa a ligação β (1-4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina do peptidoglicano que constitui a parede celular das bactérias Gram-positivas e, em conjunto com o complemento, pode destruir algumas Gram-negativas, além de ser uma potente opsonina. Esta proteína encontra-se em todos os fluidos corporais, excepto no fluido cefalorraquidiano, no suor e na urina (Tizard, 2004). Na glândula mamária é sintetizada localmente e transportada a partir do sangue (Vilela, 1993).

Os enzimas lactoperoxidase, produzido em baixas concentrações pela glândula mamária, e mieloperoxidase, produzido pelos neutrófilos, na presença de tiocianato e de peróxido de hidrogénio, produzem hipotiocianato, que é bacteriostático para as bactérias Gram-positivas e bactericida para as Gram-negativas. Porém, não se conhece a sua eficiência na glândula mamária dos ruminantes (Sordillo *et al.*, 1997). Ainda a xantina-oxidase é um enzima presente na membrana dos glóbulos de gordura do leite que catalisa a formação de óxido nítrico, a partir de nitritos inorgânicos, que em aerobiose leva à produção de peroxinitrito bactericida (Rainard e Riollot, 2006).

Os anticorpos naturais são produzidos sem haver estimulação por um antígeno estranho. São auto-anticorpos polireactivos, dirigidos contra antígenos próprios, e que podem ter um papel importante na defesa inata da glândula mamária (Rainard e Riollot, 2006).

As citocinas também são importantes para a defesa da glândula mamária. Determinadas citocinas promovem a multiplicação de células fagocitárias, como os factores que estimulam a multiplicação de granulócitos e macrófagos, *granulocyte macrophage-colony stimulatory factor* (GM-CSF) e G-CSF, outras são factores pró-inflamatórios que actuam sobre as células endoteliais dos vasos sanguíneos para promover a leucodiapedese, como TNF- α , IFN- γ e IL-1, outras ainda actuam como factores quimiotácticos para leucócitos e linfócitos, como a IL-8. Além destas acções, algumas destas citocinas estimulam as células fagocitárias melhorando as suas capacidades para fagocitar e lisar os microrganismos (Daley *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1994; Wedlock *et al.*, 2000).

Certas citocinas são produzidas e estão presentes na glândula mamária saudável, enquanto outras são detectadas após infecção. As citocinas IL-2 e INF- γ estão normalmente presentes no leite de ruminantes, embora em quantidade diminuída no final da gestação, altura em que a susceptibilidade a infecções intramamárias está aumentada. Estas duas citocinas revelaram aumentar a actividade celular dos fagócitos mamários e melhorar a resistência a mastite (Babiuk *et al.*, 1991; Sordillo *et al.*, 1991). A citocina IL-1 α é constitutivamente expressa pelas células epiteliais de glândula mamária de ovino (Vilela, 1993). Embora não tenha sido referida a sua presença no leite de ruminantes, a citocina G-CSF é segregada no leite humano (Calhoun *et al.*, 2000). Esta citocina, administrada a vacas em lactação, promove o acesso de neutrófilos à glândula mamária e potencia as suas actividades fagocítica e bactericida (Nickerson *et al.*, 1989c; Kehrl *et al.*, 1991). Após estimulação antigénica, outras citocinas são produzidas na glândula mamária pelas células endoteliais, pelos leucócitos e pelas células epiteliais, nomeadamente, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e GM-CFS (Vilela, 1993; Barber *et al.*, 1999; Burton e Erskine, 2003; Bannerman *et al.*, 2004). Recentemente foi descrita a produção de proteína quimiotáctica para os granulócitos (*granulocyte chemotactic protein-2*, GCP-2) por

células de epitélio mamário bovino *in vitro* após estimulação com ácido lipoteicoico (Lee *et al.*, 2005).

Resposta adaptativa

A resposta imunológica adaptativa da glândula mamária face a agentes patogénicos é desenvolvida por linfócitos e imunoglobulinas, com a participação de células apresentadoras de antígeno.

Os linfócitos são as únicas células do sistema imunitário que, através dos seus receptores de antígeno especiais, reconhecem estruturas específicas nos agentes estranhos, conduzindo a uma resposta dirigida para essa mesma estrutura. A resposta imunológica é evolutiva, isto é, vai-se tornando cada vez mais eficaz e, graças aos linfócitos de memória, uma resposta secundária a um determinado antígeno é mais rápida, mais eficiente e mais duradoura do que a resposta primária.

Os linfócitos B, depois de seleccionados pelos respectivos antígenos, proliferam e, após diferenciação em plasmócitos, produzem as imunoglobulinas ou anticorpos. Em cada clone produzido pela proliferação de cada linfócito estimulado, uma parte das células não se diferencia em plasmócitos, passando a constituir as células de memória.

Os linfócitos T são sensibilizados por antígenos apresentados à superfície de células apresentadoras de antígeno, macrófagos, células dendríticas ou linfócitos B. Após proliferação, entram em actividade permanecendo, porém, algumas destas células estimuladas como células de memória.

Os linfócitos T agrupam-se em duas subpopulações, de acordo com o tipo de cadeias peptídicas que constituem os receptores de antígeno, os linfócitos T $\alpha\beta$ e os linfócitos T $\gamma\delta$. O primeiro grupo compreende dois tipos de células que se distinguem com base na presença/ausência de um dos dois marcadores de superfície, CD4 e CD8. Os linfócitos T que possuem o marcador CD4 (CD4+) são linfócitos T *helper* (Th) e produzem várias citocinas que estimulam outros linfócitos e células apresentadoras de antígeno, com a finalidade de regular a resposta imunológica. Entre estes podem ainda distinguir-se os linfócitos Th1 e os

linfócitos Th2, conforme as citocinas que segregam. Os linfócitos T CD8+ segregam enzimas capazes de destruir células e bactérias e são designados por linfócitos T citotóxicos (Tc). Alguns linfócitos têm um efeito supressor da resposta imunológica, podendo ser CD4+ ou CD8+ (Tizard, 2004). Os linfócitos T $\gamma\delta$ existem apenas em baixas percentagens (5% a 15%) no sangue humano e em ratinhos, mas nos ruminantes podem chegar a 60% dos linfócitos sanguíneos (Tizard, 2004), aparecendo em níveis ainda superiores no parênquima e nas secreções mamárias (Sordillo *et al.*, 1997). Estas células têm uma acção citotóxica, podem mediar a actividade de células NK e são importantes na defesa face a infecções bacterianas. A percentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ no parênquima mamário decresce significativamente em períodos de maior susceptibilidade, sugerindo que este tipo de linfócitos constitui uma linha de defesa fundamental contra bactérias causadoras de mastite.

A presença de linfócitos Th, produtores de citocinas, na glândula mamária é importante para atrair leucócitos, para os imobilizar *in situ* e para potenciar a capacidade fagocitária e aumentar a lise intracelular dos microrganismos fagocitados (Targowski, 1983). No entanto, ao contrário do que acontece no sangue, os linfócitos T CD8+ predominam na glândula mamária em relação aos linfócitos T CD4+. Durante a lactação, os linfócitos T CD8+ são predominantemente do tipo citotóxico mas, no período pós-parto, estas células são principalmente linfócitos T supressores (Sordillo *et al.*, 1997). Num estudo para averiguar a dinâmica dos linfócitos T durante um processo mastítico em bovinos, Soltys e Quinn (1999) verificaram que o aumento de cada subtipo de células T na glândula mamária, durante a mastite, dependia do agente etiológico. Vacas com mastite estafilocócica apresentaram principalmente acréscimo de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+, enquanto em animais com mastite estreptocócica, este aumento se referiu aos dois tipos CD4+ e CD8+. Em ambos os casos houve também aumento de linfócitos T $\gamma\delta$.

Os linfócitos T e B, que ainda não contactaram com um antigénio – ainda não foram sensibilizados –, circulam através de órgãos linfáticos secundários de forma a facilitar o seu encontro com os antigénios. Porém, os linfócitos já sensibilizados, células efectoras e células de memória, apesar de também passarem por aqueles

órgãos, têm a capacidade de circular de uma forma extra-linfóide. A maioria dos linfócitos maduros, portanto, recircula continuamente entre o sangue e os tecidos, sendo a passagem de linfócitos do sangue para os tecidos controlada de forma a que determinados linfócitos cheguem a tecidos particulares. Este comportamento, designado por *homing*, é dirigido por uma variedade de receptores nos linfócitos, receptores de *homing*, e de ligandos nas células endoteliais das vénulas pós-capilares, onde se dá a extravasão. Este *homing* selectivo para determinados tecidos dirige os linfócitos de memória e imunoblastos para locais onde provavelmente encontrarão o respectivo antigénio (Butcher e Picker, 1996).

Existem duas vias principais de recirculação de linfócitos, a periférica associada á pele (*skin associated linfoid tissue*, SALT) e a mucosa (*mucosal associated linfoid tissue*, MALT), esta dividida em *gut associated linfoid tissue* (GALT) e *bronchial associated linfoid tissue* (BALT). Ao contrário do que acontece nos monogástricos, nos ovinos e bovinos, os linfócitos mamários recirculam segundo o padrão dos linfócitos periféricos, tendo sido descrito que uma grande percentagem dos linfócitos mamários bovinos possui receptores de *homing* específico para ligandos nos linfonodos periféricos. Este facto explica o comportamento dos linfócitos mamários e a sua ligação ao SALT (Kehrl e Harp, 2001).

A defesa imunológica específica humoral na glândula mamária de ovelha é realizada por anticorpos ou imunoglobulinas (Igs), IgA, IgG e Ig M. Nas ovelhas, a classe de IgA compõe-se de duas subclasses, IgA1 e IgA2, sendo a IgG composta pelas subclasses IgG1, IgG2 e IgG3. Não dispomos de informação detalhada sobre a IgA1, a IgA2 e sobre a IgG3, porém a IgG1 e a IgG2 têm acções biológicas diferentes e as suas concentrações relativas diferem nos diferentes locais do organismo (Tizard, 2004). Contrariamente ao que acontece nos monogástricos, nos quais a imunoglobulina predominante no leite é a IgA, no leite dos ruminantes a IgG aparece em maior quantidade do que os outros isotipos (Tabela 2). As IgG e IgM têm como principal função opsonizar os microrganismos para potenciar a fagocitose por parte dos macrófagos e dos neutrófilos. Nas ovelhas, a IgG2 tem uma capacidade para opsonizar significativamente maior do que a IgG1 (Watson, 1989). As IgA, são transferidas por pinocitose através das células do epitélio mamário para o lume da glândula

(Nickerson, 1989a), onde têm um papel fundamental na exclusão imunitária, isto é, ligam-se aos agentes patogénicos, impedindo a sua ligação às células epiteliais, contrariando a colonização. Estas imunoglobulinas são também importantes na neutralização de toxinas que são produzidas por vários agentes etiológicos de mastite e, embora geralmente não sejam referidas como opsoninas, já foi relatada a sua actividade opsonizante face a *Strep. agalactiae* (Mackie *et al.*, 1986). No entanto, estudos mais recentes que avaliaram a importância da opsonização por IgA, revelaram que este isotipo não é importante como opsonina para a fagocitose de *Staph. aureus* por neutrófilos de bovino (Barrio *et al.*, 2003).

Tabela 2: Teor de imunoglobulinas no colostro e leite de ovelha

(adaptado de Tizard, 2004)

Classe de Ig	Colostro (mg/dL)	Leite (mg/dL)	Subclasse de Ig
IgA	100 - 700	5 - 12	A1, A2
IgG	4 000 - 6 000	60 - 100	G1, G2, G3
IgM	400 - 1 200	0 - 7	M

Como se poderá constatar da observação da Tabela 2, o nível de anticorpos normalmente presente no leite de ovino é muito baixo, inferior a 2 mg/mL. No entanto, durante um processo de mastite, pode chegar a 80 mg/mL.

As Igs presentes no leite de ovelha podem ser produzidas localmente ou ser transportadas a partir do sangue para a glândula mamária. De acordo com Tizard (2004), as IgA são produzidas localmente no tecido mamário e as IgG são transportadas activamente a partir do sangue, utilizando um receptor específico nas células epiteliais. Segundo Berthon e Salmon (1993), na ovelha, a IgA é produzida localmente durante o período de involução, mas é transportada a partir do sangue durante a lactação. Porém, relativamente a outras espécies, há referências que indicam a possibilidade de qualquer das classes, IgA, IgG e IgM, poder ser transportada a partir do soro ou produzida na própria glândula mamária.

Nos bovinos, a IgG1 é transportada, do sangue para a glândula mamária, através de um mecanismo de transporte activo que envolve receptores de Fc específicos

para esta subclasse de Ig, situados na membrana citoplasmática das células do epitélio mamário, os quais aumentam no final do período pré-parto. Quando o transporte do soro para o leite diminui, a IgG1 passa a ser produzida por plasmócitos residentes na glândula mamária (Kehrli e Harp, 2001). Também nesta espécie, a IgG1 é o isotipo predominante no leite produzido por uma glândula saudável, mas durante um processo inflamatório, a IgG2 é transportada para o leite pelos neutrófilos, ligada a receptores específicos para esta subclasse (Tizard, 2004). A concentração de IgG2 no leite está relacionada com a contagem de células somáticas. No entanto, esta imunoglobulina pode também ser transportada a partir do sangue, passiva e activamente, e sintetizada localmente (Caffin e Poutrel, 1988). Relativamente a IgG1, não existe qualquer relação entre a CCS e a sua concentração no leite (Caffin *et al.*, 1983). Plasmócitos produtores de imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgA e IgM foram observados nas secreções mamárias de bovinos (Chang *et al.*, 1981; Sordillo e Nickerson, 1988; Nickerson, 1989a).

Como já foi referido, a capacidade de resistência da glândula mamária face a agentes etiológicos de mastite não é constante ao longo da lactação. A susceptibilidade a mastites está aumentada no período pós-parto e no final da lactação.

Relativamente ao período pós-parto, vários factores têm sido apontados como responsáveis pela imunodepressão ao nível da glândula mamária. Devido ao efeito diluidor do leite, cuja produção é rapidamente aumentada, a quantidade de células fagocitárias e linfócitos T diminui muito nesta fase. Além disso, no período peri-parto o nível de cortisol no sangue aumenta, criando um ambiente anti-inflamatório. Consequentemente, diminui a expressão de moléculas de adesão nos PMNs, diminuindo a marginalização, a leucodiapedese torna-se mais lenta e a activação celular é prejudicada (Burton e Erskine, 2003). Durante este período, os linfócitos T CD8+ apresentam uma acção citotóxica limitada, sendo maioritariamente supressores; os linfócitos T CD4+ são principalmente Th2, causando uma baixa produção de IL-2 e IFN- γ , visto que estas citocinas são principalmente segregadas por linfócitos Th1; a percentagem de linfócitos T $\gamma\delta$

está diminuída; os linfócitos B estão menos activos, apesar de não estarem diminuídos em quantidade (Paape *et al.*, 2000).

No final da lactação, no início do período de involução da glândula mamária, são também diversos os factores que podem contribuir para o aumento da susceptibilidade a mastites. Apesar de, com a diminuição na produção de leite, haver uma concentração das células fagocitárias e linfóides, a actividade dos neutrófilos está comprometida a tentar eliminar componentes do leite e detritos celulares. Além disso, nesta fase, tal como durante a colostrogénese, existe na secreção da glândula mamária um factor que se liga especificamente aos receptores para a fracção Fc das imunoglobulinas, na parede dos fagócitos, diminuindo a sua acção fagocitária (Nickerson, 1989a). E, ainda, um aspecto muito importante é a falta do efeito mecânico do fluxo de leite, o qual durante a lactação contraria a colonização do epitélio mamário por microrganismos.

Contribuição das células do epitélio mamário

As células epiteliais da glândula mamária, após interacção com os microrganismos patogénicos, têm capacidade de produzir defensinas, quimoquinas, citoquinas e ácido araquidónico. Apesar de não estar ainda esclarecido o seu papel na defesa da glândula, as células do epitélio mamário têm aptidão moduladora, actuando de forma autócrina e parácrina e, possivelmente, estão envolvidas na chamada de neutrófilos e Linfócitos à glândula mamária (Rainard e Riollot, 2006).

1.6 – AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NO CONTROLO DE MASTITES

Segundo Todar (2002), podem distinguir-se dois tipos de agentes antimicrobianos usados para o tratamento de doenças infecciosas: antibióticos, que são substâncias naturais produzidas por microrganismos, e agentes quimioterápicos, os quais são quimicamente sintetizados. O mesmo autor distingue ainda antibióticos semi-sintéticos, resultantes de moléculas de origem microbiana modificadas artificialmente, e antibióticos sintéticos, sintetizados totalmente por meios químicos, embora sejam iguais aos naturalmente produzidos. É, contudo, frequente designar por antibióticos *sensum lato* todos estes agentes antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos são extensamente utilizados para o controlo de mastites em ruminantes. A sua utilização pode ser terapêutica, quando são administrados a animais afectados, ou profilática, através do chamado tratamento de secagem, que consiste na administração de agentes antimicrobianos após a última ordenha, com o objectivo de reduzir a incidência de mastites durante o período seco e no início da lactação seguinte. A administração local na glândula mamária, por instilação através do canal do teto é a via de administração preferencial visto que, após administração sistémica, a difusão do sangue para o leite é reduzida. No entanto, em determinadas situações, como a ocorrência de mastite hiperaguda ou obstrução dos canais galactóforos, a via sistémica deve ser utilizada e a dose de produto a administrar deve ser superior à dose por kg normalmente utilizada, de forma a atingir níveis terapêuticos na secreção mamária.

Preliminarmente à execução deste trabalho, averiguámos a composição dos medicamentos de aplicação intramamária disponíveis no mercado português. Passamos a descrever apenas os agentes antimicrobianos presentes nestes medicamentos, de acordo com a sua estrutura química e o modo de acção sobre os microrganismos.

Os agentes antimicrobianos podem actuar sobre a célula bacteriana de diversas formas, podendo inibir a síntese da parede celular, alterar a membrana citoplasmática, inibir a síntese de proteínas, interferir com os ácidos nucleicos ou competir com factores de crescimento da bactéria.

Inibidores de crescimento da parede celular

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos inclui as penicilinas, os monobactâmicos, as cefalosporinas e os carbapenemes. Quimicamente, estes antibióticos contêm um anel β -lactâmico com quatro elementos, três átomos de carbono e um de azoto. Este anel liga-se ao enzima transpeptidase, inibindo a sua acção para estabelecer a ligação cruzada entre as cadeias laterais penta-peptídicas que ligam as várias camadas no peptidoglicano da parede bacteriana. A sua acção é geralmente bactericida, mas é necessário que as bactérias estejam numa fase de crescimento activo.

A **penicilina** foi o primeiro antibiótico conhecido. Descoberta acidentalmente por Fleming em 1929, é produzida pelo fungo *Penicillium notatum*. A benzil-penicilina ou penicilina-G é encontrada em alguns medicamentos de aplicação intramamária. Esta é uma penicilina natural, produzida pela fermentação do *Penicillium chrysogenum*, activa face a cocos Gram-positivos, cocos Gram-negativos e bacilos Gram-positivos, mas que apenas actua contra bacilos Gram-negativos em doses muito elevadas (Livermore e Williams, 1996). A penicilina G é sensível às β -lactamases estafilocócicas

A **ampicilina** e a **cloxacilina** são penicilinas semi-sintéticas que integram alguns dos medicamentos referidos. Graças à adição de uma cadeia lateral ao 6-ácido aminopenicilânico, estes antibióticos β -lactâmicos são resistentes às β -lactamases estafilocócicas. No caso da ampicilina, a cadeia lateral confere-lhe também um espectro de acção mais alargado do que a penicilina G, nomeadamente face a determinadas bactérias Gram-negativas.

As cefalosporinas, produzidas por fungos do género *Cephalosporium*, podem ser classificadas em quatro grupos, cujos componentes diferem na sua acção antibacteriana. As cefalosporinas do grupo I são principalmente activas para bactérias Gram-positivas, sendo resistentes às β -lactamases estafilocócicas. No

entanto, apresentam uma fraca acção anti-Gram-negativos. Os compostos do grupo II são activos contra enterobactérias, sendo alguns resistentes às β -lactamases produzidas por estas bactérias, mas menos eficientes face a bactérias Gram-positivas do que as cefalosporinas do grupo I. O grupo III é constituído pelas chamadas cefalosporinas anti-pseudomonas, das quais a maior parte revela também boa actividade antibacteriana face a enterobactérias e algumas conservam uma actividade considerável contra bactérias Gram-positivas. As cefalosporinas do grupo IV são resistentes a muitas β -lactamases, nomeadamente às produzidas por *Bacteroides spp.* (Livermore e Williams, 1996).

Duas cefalosporinas do grupo II, a **cefalexina** e a **cefuroxima** e uma pertencente ao grupo III, a **cefoperazona** integram a composição de preparações medicamentosas de aplicação intramamária.

A **bacitracina** está incluída no grupo dos antibióticos polipeptídicos, que se caracterizam quimicamente por consistirem numa cadeia de aminoácidos. A bacitracina pode ser produzida pelo *Bacillus subtilis* e pelo *Bacillus licheniformis*. Este antibiótico inibe o crescimento da parede celular por impedir que as subunidades muropeptídicas, necessárias para este crescimento, se libertem da molécula lipídica que as transporta para o lado exterior da membrana. A síntese de ácidos teicoicos, que também utiliza a mesma molécula transportadora, é conjuntamente inibida. Devido à sua alta toxicidade, a bacitracina não deve ser utilizada por via sistémica, mas pode usar-se topicamente e, também, para actuar ao nível da mucosa intestinal, visto que não é absorvida pelo intestino. Pode, portanto, ser utilizada por via intramamária.

Inibidores da membrana citoplasmática

A **polimixina**, produzida pelo *Bacillus polymyxa*, é um antibiótico polipeptídico, em que a cadeia de aminoácidos é circular. Outro antibiótico polipeptídico, a **colistina** é um derivado da polimixina B. A acção antibacteriana destes agentes deve-se ao facto de se ligarem aos fosfolípidos da membrana plasmática, alterando a sua permeabilidade e rapidamente provocarem a lise da célula. Dada a semelhança entre as membranas das células procarióticas e das células eucarióticas, a sua utilização está limitada a aplicações tópicas, podendo

constituir medicamentos de aplicação intramamária. Estes antibióticos são eficientes principalmente face a bactérias Gram-negativas.

Inibidores da síntese de proteínas

Os antibióticos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos são produzidos por espécies de *Streptomyces*. Quimicamente, consistem em açúcares aminados e uma estrutura cíclica chamada aminociclitol. Dentro deste grupo, foram encontrados na composição de antimastíticos a **estreptomina**, a **gentamicina** e a **neomicina**. O modo de acção destes agentes produz-se através da sua ligação à subunidade 30S dos ribosomas bacterianos, impedindo a iniciação da síntese de proteínas. Face a bactérias Gram-positivas, os aminoglicosídeos são bacteriostáticos, mas são bactericidas contra bactérias Gram-negativas e a sua acção muito rápida deve-se, não ao efeito sobre a síntese proteica, mas ao facto de serem capazes de deslocar e competitivamente substituir os iões de Mg^{2+} e Ca^{2+} que ligam as moléculas polissacarídicas, deixando poros na parede celular (Stratton, 1996).

Alguns medicamentos antimastíticos contêm **oleandomicina**, que é um macrólido produzido pelo *Streptomyces antibioticus*. Os antibióticos que constituem esta família caracterizam-se por estruturas que contêm um grande anel de lactona ligado a açúcares aminados. Actuam através da sua ligação à fracção 50S do ribossoma bacteriano, inibindo o alongamento da proteína pela peptidil-transferase, ou impedindo a translocação do ribossoma, ou produzindo ambos os efeitos. Daí resulta um efeito bacteriostático para a maioria dos microrganismos sensíveis, mas bactericida para algumas espécies de bactérias Gram-positivas.

A **lincomicina**, produzida por *Streptomyces lincolnensis*, embora não pertença ao grupo dos macrólidos, tem um modo de acção semelhante a estes antibióticos (Stratton, 1996), o qual se exerce face a bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. Este antibiótico está disponível em medicamentos de aplicação intramamária.

As tetraciclina consistem num grupo de antibióticos que têm uma estrutura química comum, o anel naftaleno. A desigualdade entre as várias tetraciclina é devida a diferenças nos grupos químicos ligados ao anel naftaleno. De entre

estes antibióticos, apenas a **oxitetraciclina** foi encontrada na constituição de produtos antibacterianos de aplicação intramamária. Todas as tetraciclina são antibióticos de largo espectro, naturalmente produzidas por bactérias do género *Streptomyces*, embora algumas possam também ser produzidas de forma sintética ou semi-sintética. Estes agentes antibacterianos actuam bloqueando a ligação do RNA-transferência ao ribosoma, tanto no ribosoma procariótico como no ribosoma eucariótico. No entanto, a maioria das bactérias transporta activamente as tetraciclina, de forma que a concentração intracelular de antibiótico atinge uma concentração 50 vezes superior à concentração no meio exterior, garantindo a acção específica sobre a bactéria e aumentando muito a acção antibacteriana.

Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

A **novobiocina**, também presente em medicamentos antimastíticos, é produzida pelo *Streptomyces niveus* e pertence ao grupo dos antibióticos aminocumáricos. A sua actividade antibacteriana deve-se à inibição do enzima DNA-girase, o qual é responsável por desenrolar a hélice de DNA para permitir a sua replicação (Gellert *et al.*, 1976).

As ansamicinas ou rifamicinas são um grupo de antibióticos originalmente isolados do microrganismo do solo *Streptomyces mediterranei*. A **rifampicina** é um derivado semi-sintético da rifamicina, cuja acção antibacteriana resulta da sua ligação ao enzima RNA-polimerase, impedindo a síntese de RNA-mensageiro. Este antibiótico é activo face a bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas.

Inibidores competitivos

Os agentes quimioterápicos, que são inibidores competitivos de metabolitos essenciais ou factores de crescimento necessários para o metabolismo bacteriano, são também designados por anti-metabolitos ou análogos de factores de crescimento. Estes agentes antibacterianos inibem especificamente uma via metabólica essencial da bactéria e a sua toxicidade selectiva deve-se ao facto de a via metabólica afectada não ocorrer no hospedeiro. A sua estrutura química é semelhante a um factor de crescimento ou metabolito, mas não desempenha o

respectivo papel metabólico na célula bacteriana, daí resulta a sua acção bacteriostática ou bactericida.

As células eucarióticas produzem o ácido tetra-hidro-fólico (THF) reduzindo a vitamina ácido fólico. Porém, as bactérias sintetizam o seu próprio ácido THF, a partir do ácido para-amino-benzoico (PABA), que é um aminoácido não proteico. Na célula procariótica, o PABA é transformado em ácido di-hidro-fólico (DHF) e este em ácido THF. As **sulfamidas** são estruturalmente semelhantes ao PABA e o **trimetoprim** é análogo do ácido DHF. A utilização destes compostos, erroneamente, pela bactéria, impede a formação do produto final, o ácido THF.

Eficácia dos agentes antimicrobianos

Os agentes antibacterianos constituem, de facto, o meio mais utilizado na profilaxia médica e no tratamento de mastite em ruminantes. Porém, o êxito obtido, tanto ao nível da prevenção como em termos de cura, está longe de atingir os resultados desejáveis.

O insucesso da antibioterapia pode dever-se a problemas de farmacocinética, ou seja à dificuldade do agente antimicrobiano atingir o local onde os microrganismos estão situados, ou de farmacodinâmica, isto é à falta de capacidade para inibir a multiplicação ou lisar o microrganismo em causa.

As causas possíveis apontadas para o insucesso do tratamento antibiótico de mastite foram esquematizadas por Sandholm e colaboradores (1990) e são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Causas de insucesso da antibioterapia em mastites(adaptado de Sandholm *et al.*, 1990)

1. Os antibióticos não atingem o local de infecção em concentrações adequadas por:
 - a) não ser mantida a quantidade adequada de antibiótico durante o período de tempo necessário: dose insuficiente, intervalo entre doses demasiado longo, período de tratamento curto;
 - b) limitações devidas a farmacocinética:
 - i) absorção, disposição, eliminação;
 - ii) ionização do produto;
 - iii) bloqueios durante o tratamento intramamário (edema, oclusão dos canais galactóforos);
 - iv) deficiente passagem da barreira sangue-leite depois de administração parenteral;
 - v) ligação do antibiótico a proteínas do soro ou do leite;
 - vi) parasitismo intra-celular;
2. Resistência ao antibiótico ou desenvolvimento de resistência.
3. Dormência bacteriana.
4. Formas L de bactérias (resistentes aos β -lactâmicos).
5. Alguns antibióticos deprimem a fagocitose.
6. Reinfecção:
 - a) a partir de um inóculo remanescente;
 - b) a partir do canal do teto;
 - c) a partir de outra fonte, devido a higiene deficiente, *etc.*

Várias razões relacionadas com a farmacocinética podem estar na base do insucesso muitas vezes obtido com o uso de agentes antimicrobianos no tratamento e profilaxia de mastite. São disso exemplo os casos em que a oclusão dos canais galactóforos ou o edema na glândula mamária impedem o acesso do princípio activo ao local da infecção.

Outra forma de bloqueio provém da capacidade que algumas bactérias têm de produzir uma matriz exopolissacarídica, onde ficam incluídas, formando um biofilme, que lhes confere um tipo de resistência especial aos agentes antibacterianos. Com efeito, apesar de as bactérias incluídas no biofilme não apresentarem maior resistência aos antibióticos do que as células planctónicas da mesma população, mesmo utilizando antibióticos com elevada capacidade de difusão através do biofilme, após uma forte redução na população bacteriana, o antibiótico deixa de actuar. As células que persistem param de crescer, por influência do próprio antibiótico e deixam de lhe ser susceptíveis. Protegidas pelo biofilme, evadem-se ao efeito dos mecanismos de defesa do animal e, quando

deixam de estar em contacto com o antibiótico, voltam a crescer com as mesmas características que tinham anteriormente, nomeadamente, voltam a apresentar susceptibilidade ao antibiótico (Lewis, 2001). Melchior e colaboradores (2006) referem uma maior resistência a antibióticos de bactérias causadoras de mastite em biofilmes mais antigos, relativamente a biofilmes recém-formados, salientando a importância do tratamento precoce de mastites.

A estrutura química dos agentes antimicrobianos também determina o seu comportamento em termos de farmacocinética. Os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, cujo pH é ácido, dificilmente atravessam a barreira sangue-leite, visto que o gradiente de pH entre o sangue e o leite de uma glândula saudável é de 7,4:6,7. Quando administrados por via intramamária, estes antibióticos apresentam uma boa actividade na fase leite. Outro factor importante é a lipossolubilidade, uma elevada solubilidade nos lípidos favorece a penetração nos tecidos. Os aminoglicosídeos têm baixa solubilidade nos lípidos, ao contrário dos macrólidos, os quais não só manifestam uma boa dispersão nos tecidos, como a sua base orgânica favorece a difusão sangue-leite (Sandholm *et al.*, 1990).

Diversos agentes etiológicos de mastite possuem capacidade para invadir as células do epitélio mamário e aí permanecer como parasitas intracelulares, nomeadamente *Staphylococcus aureus* (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Hensen *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005), estafilococos coagulase negativos (Almeida e Oliver, 2001), *Streptococcus dysgalactiae* (Almeida e Oliver, 1995; Calvino *et al.*, 1998), *Strep. uberis* (Oliver *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2005), *Escherichia coli* (Dopfer *et al.*, 2000; 2001) e *Mannheimia haemolytica* (Vilela, 1993). Além disso, as bactérias podem permanecer viáveis dentro das células fagocitárias, tanto nos macrófagos (Hébert *et al.*, 2000) como nos polimorfonucleares neutrófilos (Gresham *et al.*, 2000). Neste refúgio intracelular, as bactérias estão protegidas da acção dos agentes antibacterianos se estes não tiverem capacidade para actuar dentro das células.

O efeito de um antibiótico sobre um microrganismo intracelular depende da penetração do medicamento na célula, da sua localização intracelular, do seu metabolismo dentro da célula e da sua acção antimicrobiana sobre o microrganismo em causa (Donowitz, 1994). Efectivamente, a capacidade de

certos antibióticos para penetrar e se concentrar dentro dos neutrófilos não está directamente correlacionada com a sua aptidão para lisar *Staphylococcus aureus* dentro da célula (Hand e King-Thompson, 1986; Madgwick *et al.*, 1989; Yancey *et al.*, 1991). A discrepância observada, em alguns antibióticos com elevada capacidade para penetrar na célula e baixa bioactividade, pode dever-se à ligação do medicamento a um determinado organito dentro da célula, à sua metabolização ou inactivação, a condições desfavoráveis dentro do fagossoma, como o baixo pH, ou a efeitos tóxicos exercidos sobre o neutrófilo (Van der Auwera *et al.*, 1991).

Os antibióticos β -lactâmicos apresentam fraca acumulação, o que significa que a concentração extracelular se mantém mais elevada do que dentro da célula, tanto em células fagocitárias como não fagocitárias. Isto acontece porque o citoplasma da célula é mais ácido do que o meio extracelular. Porém, estes antibióticos são bactericidas para bactérias livres no citosol, como *Listeria monocytogenes*, desde que sejam mantidos em contacto prolongado com as células (Carryn *et al.*, 2003)

Os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos são constituídos por moléculas grandes e de carga negativa, o que impede a sua difusão passiva através da membrana citoplasmática. Estes produtos penetram a célula através de um mecanismo activo de pinocitose da célula eucariótica, o qual é bastante lento, 48 a 72 horas depois da exposição ao antibiótico, após o que são inactivados pelo pH ácido no lisosoma (Maurin e Raoult, 2001).

Os antibióticos macrólidos, como são bases fracas, exibem uma acumulação intracelular marcada em quase todas as células, variando, no entanto, consoante o antibiótico considerado. Devido à sua estrutura básica, acumulam-se em grande quantidade nos lisosomas (dois terços lisosoma/um terço citosol), onde a sua actividade sofre inibição devido ao pH muito ácido. Portanto, mesmo em grandes quantidades dentro da célula, a sua actividade antimicrobiana face a *Staph. aureus* é menor do que no meio extracelular (Carryn *et al.*, 2003).

Além dos antibióticos referidos, têm actividade antimicrobiana intracelular as fluoroquinolonas, que não foram estudadas no âmbito deste trabalho, as tetraciclínas e as ansamicinas (Carryn *et al.*, 2003). Este último grupo de

antibióticos beneficia do facto de a sua acção ser ampliada num meio cujo pH seja ácido (Sanchez *et al.*, 1988).

Também a combinação dos agentes quimioterápicos trimetoprim/sulfametoxazole revelou capacidade lítica intracelular, *in vitro*, face a *Staph. aureus* (Jacobs e Wilson, 1983).

No que respeita a problemas de farmacodinâmica, há situações em que o agente etiológico possui mecanismos de resistência para o antibiótico utilizado no seu controlo, mas também pode estabelecer-se uma população bacteriana resistente, por pressão de selecção sobre uma população inicialmente susceptível.

Frequentemente, o antibiótico utilizado é escolhido sem ser avaliada previamente a sua eficácia face aos agentes patogénicos que se pretende combater. Para o tratamento de mastite clínica, a absoluta necessidade de o tratamento ser precoce, impossibilita o prévio estudo laboratorial de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, que é excessivamente moroso. Também a escolha do medicamento a utilizar para profilaxia das infecções intramamárias pode não ser apropriada, se não se dispuser de informações sobre o microbismo instalado no efectivo animal.

Nas situações referidas podemos atribuir a falha do antibiótico à respectiva resistência do ou dos agentes etiológicos. A infecção da glândula mamária pode ser protagonizada por bactérias resistentes ao agente antibacteriano utilizado, mas também pode acontecer que microrganismos inicialmente susceptíveis desenvolvam resistência através de uma mutação genética e posterior selecção. Estabelece-se, então, uma estirpe descendente do mutante, por pressão do próprio antibiótico, que elimina as bactérias susceptíveis. A taxa de mutação para a maioria dos genes bacterianos é aproximadamente 10^{-8} . Isto significa que, ao duplicar uma população de 10^8 bactérias para 2×10^8 , é possível haver uma mutação. Como as bactérias atingem populações com densidades superiores a 10^9 células, esta mutação pode desenvolver-se numa só geração, durante 15 minutos de crescimento (Todar, 2002). A pressão de selecção exercida pelo antibiótico pode também incidir sobre bactérias que adquiriram factores de resistência, inscritos em plasmídeos anteriormente transferidos de bactérias

resistentes, através de conjugação ou mesmo transformação, ou ainda pode levar à expressão de um gene promotor responsável pela expressão de genes de resistência “silenciosos” (Davies, 1992). Diversos estudos científicos demonstram fortes evidências de que a utilização de antibióticos para o controlo de mastites é responsável pela pressão de selecção de estirpes de microrganismos resistentes, as quais são implicadas em infecções intramamárias (Boutet e Lekeux, 2005; Rajala-Schultz *et al.*, 2005).

Diferentes mecanismos bioquímicos podem ser responsáveis pela resistência aos agentes antimicrobianos. O microrganismo pode produzir enzimas que inactivam o antibiótico, como por exemplo as β -lactamases, pode alterar a sua parede de forma a reduzir a penetração do antibiótico ou pode expressar proteínas na membrana citoplasmática que bombeiam o antibiótico para fora da célula, como acontece numa das formas de resistência à tetraciclina. Outro tipo de proteína pode ser expresso pela bactéria cuja função é sequestrar o antibiótico, isto é, a proteína liga-se ao antibiótico de forma a impedir a sua acção. As bactérias podem, também alterar a estrutura do organito alvo do antibiótico, como acontece na resistência a macrólidos e a aminoglicosídeos, em que o ribossoma se torna refractário após uma específica modificação enzimática do RNA ribosomal. Ainda outro mecanismo de resistência é a capacidade da bactéria para desenvolver uma forma alternativa de prosseguir o seu metabolismo, evitando a reacção afectada pelo agente antibacteriano (Davies, 1992).

A utilização de antibióticos inibidores da parede bacteriana pode induzir, na própria glândula mamária, a formação de formas-L de bactérias Gram-positivas, as quais são bactérias desprovidas de parede celular, mas que, no entanto, são viáveis. Estas bactérias, após ser retirado o antibiótico, revertem à sua forma habitual e readquirem todas as suas características anteriores. Após tratamento intramamário com cloxacilina, de vacas infectadas experimentalmente com *Staph. aureus*, o leite recolhido e inoculado, num meio de cultura apropriado para o crescimento de formas-L, revelou a presença de microrganismos viáveis, embora as culturas em meios habitualmente utilizados para o diagnóstico de mastite resultassem negativas. As colónias das formas-L, quando repicadas para os

meios de cultura tradicionais, reproduziram colónias de *Staph. aureus* típicas (Sears *et al.*, 1987).

Relativamente à acção dos agentes antimicrobianos sobre as células fagocitárias, a utilização de antibióticos na glândula mamária pode interferir com o recrutamento destas células, principalmente polimorfonucleares neutrófilos (PMN), podendo também influenciar a sua capacidade fagocitária e ainda a aptidão destas células para lisar as bactérias fagocitadas.

Alguns antibióticos após administração por via intramamária estimulam leucodiapedese na glândula, como acontece com a novobiocina (Lintner e Eberhart, 1990b). Por outro lado, tem sido frequentemente referido que alguns antibióticos inibem a fagocitose. De entre os antibióticos incluídos no presente estudo, têm efeito negativo sobre a capacidade fagocitária de PMNs mamários *in vitro*, a polimixina B, embora ligeiramente (Nickerson *et al.*, 1985), a gentamicina (Nickerson *et al.*, 1985; Pappe *et al.*, 1991), a novobiocina (Lintner e Eberhart, 1990a; b; Pappe *et al.*, 1991) e a rifampicina (Nickerson *et al.*, 1985). Associada à diminuição da capacidade de PMNs para fagocitar, há uma redução na sua aptidão para lisar as bactérias fagocitadas, que se deve a alterações morfológicas das células, nomeadamente a perda de pseudópodes, o núcleo arredondado e a diminuição na quantidade de grânulos presentes no citoplasma (Lintner e Eberhart, 1990a).

Outros antibióticos, porém, não interferem com a capacidade fagocitária. Os antibióticos β -lactâmicos, geralmente, não interferem com esta actividade de PMNs *in vitro*. Os antibióticos estudados que integram este grupo, a penicilina, a ampicilina, a cloxacilina e as cefalosporinas, cefuroxima e cefoperazona, não provocam alterações na capacidade fagocitária das células. Também a bacitracina e os aminoglicosídeos, estreptomina e neomicina, não prejudicam a fagocitose e, apesar de outras tetraciclina poderem inibir esta capacidade, a oxitetraciclina não interfere negativamente (Pappe *et al.*, 1991). Similarmente, a lincomicina não deprime a capacidade fagocitária de PMNs mamários (Nickerson *et al.*, 1985).

Apesar das limitações apontadas, a utilização de antibióticos, em explorações de bovinos leiteiros, para o tratamento e profilaxia de mastites tem permitido baixar a incidência de mastites clínicas e subclínicas e melhorar a qualidade do leite produzido ao longo dos anos (Pitkala *et al.*, 2004; Smith, 2005).

As preparações medicamentosas de aplicação intramamária que existem no mercado nacional são concebidas para bovinos. A utilização destes produtos, em ovelhas, é bem tolerado pela glândula mamária. No entanto, em ovelhas lactantes, o intervalo de segurança deverá ser aproximadamente três vezes superior ao preconizado para as vacas (Buswell, 1989). A utilização profilática de antibióticos, através do tratamento de secagem, é uma estratégia de manejo muito utilizada para bovinos. A aplicação desta medida para o controlo da mastite ovina apresenta resultados bastante positivos (Hueston *et al.*, 1989; Ahmad *et al.*, 1992b; Tietze *et al.*, 1993; Cuccuru *et al.*, 1999; McDougall e Anniss, 2005). Ahmad (1992b) refere que o efeito se faz sentir principalmente nos casos de mastite causada por *Staphylococci* coagulase negativos. Esta prática parece não comprometer a qualidade do leite produzido na lactação seguinte, no que respeita à presença de resíduos antibióticos (Lohuis *et al.*, 1995).

A implementação de programas profiláticos em ovelhas, com recurso à utilização de agentes antimicrobianos, porém, não deverá negligenciar os aspectos referidos relativamente às repercussões destes medicamentos sobre a saúde pública e a saúde animal. Assim, deverão ser sempre seguidas as regras preconizadas para o uso prudente de antibióticos em medicina veterinária (FVE, 2005).

2 – RASTREIO DE MASTITES EM OVELHAS

2.1 – INTRODUÇÃO

As infecções intramamárias nos ruminantes causam prejuízos económicos consideráveis que se traduzem em perda de animais, por morte ou refugo precoce, importantes quebras na produção de leite, na sua qualidade e rendimento tecnológico, podendo ainda pôr em risco a saúde dos consumidores.

A prevalência de MSC tem sido estudada por diversos autores, apresentando valores médios extremos de 11,1% e 55% (Bor *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990; Jones, 1991; Watkins *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1992b; Marco *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Romeo *et al.*, 1998; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; Pengov, 2001; Bio *et al.*, 2005). Os valores da prevalência de MSC, recolhidos da bibliografia, são apresentados em resumo na Tabela 4. O método de diagnóstico de MSC utilizado nos diferentes estudos, tal como a fase da lactação dos animais no momento do estudo, não foi semelhante. Não foram encontradas referências à situação de Portugal relativamente a esta afecção.

Vários factores podem condicionar a prevalência de mastites nos ovinos, nomeadamente, um maior número de borregos nascidos, que, ao mamarem, produzem maior *stress* da glândula mamária (Jones, 1991), a duração do período de aleitamento dos borregos (Dario *et al.*, 1996), as condições de alojamento dos animais (Aparicio *et al.*, 2005), o manejo higiénico da ordenha (Zeljko *et al.*, 2005) e o estado de manutenção/utilização da máquina de ordenha (Peris *et al.*, 2001). A influência da raça sobre a prevalência de mastites, nomeadamente MSC, é frequentemente referida (Tabela 5). Aparentemente a prevalência de MSC está directamente relacionada com a produção de leite, sendo superior em ovelhas de raça com maior capacidade produtiva e, dentro da mesma raça, em animais mais produtivos (De La Cruz *et al.*, 1994). Esta diferença poderá ser atribuída ao facto de as maiores produtoras estarem sujeitas a um maior *stress* produtivo e/ou traumático, por serem ordenhadas durante mais tempo.

Tabela 4: Prevalência de MSC em ovelhas

País	Método de diagnóstico (MSC)	Fase da lactação	Prevalência / ovelhas (%)			Afeção (%)		Prevalência / glândulas (%)			Referências
			Min	Máx	μ	uni	bil	Min	Máx	μ	
Espanha	CCS+An. bacteriol.		18,4	67,8	46,9			9,8	48	30,4	Marco <i>et al.</i> , 1993
Espanha	An. bacteriol.	2ª metade			36,7					25,2	De La Cruz <i>et al.</i> , 1994
Espanha	An. bacteriol.	meio			43,8						González-R. <i>et al.</i> , 1995
Espanha	TCM				18						Romeo <i>et al.</i> , 1998
	An. bacteriol.				11,1						
Espanha	An. bacteriol.	pp			23,3					14	Ziluaga <i>et al.</i> , 1998
		final			46,3					33,8	
Espanha	TCM+An. bacteriol.	várias	9	83	34	82	18	4,5	67	21	Las Heras <i>et al.</i> , 1999a
Itália	?	30d a. desm.	8,5	29,4	16	6,3	7,2				Dario <i>et al.</i> , 1996
Itália	An. bacteriol.				37						Bio <i>et al.</i> , 2005
Grécia	TCM+An. bacteriol.	90d pp	14	43	33,3			7	29	18	Stefanakis <i>et al.</i> , 1995
RU-País de Gales	An. bacteriol.				14*		1,6	4	13	9	Watson <i>et al.</i> , 1990
RU-Inglatera	WS+An. bacteriol.		6,4	18,9	11,5			3,1	11,3	6,2	Watkins <i>et al.</i> , 1991
RU			10	31							Jones, 1991
Israel	An. bacteriol.				55						Bor <i>et al.</i> , 1989
?	An. bacteriol.	pp			25					17	Ahmad <i>et al.</i> , 1992b
		desm.			22					14	
?	An. bacteriol.	8-12s pp			26,2						Pengov, 2001

* Valor de prevalência para MC + MSC

CCS – contagem de células somáticas; An. bacteriol. – análises bacteriológicas; TCM – teste californiano de mastites; WS – teste de Whiteside; d – dias; s – semanas; a. – antes; pp – pós-parto; desm. – desmame.

Existem vários métodos para diagnosticar MSC, uns realizados em laboratório, outros executados junto do próprio animal. Destes, o teste californiano de mastites é o mais utilizado, permitindo o diagnóstico rápido de MSC em explorações de vacas leiteiras (van Werven *et al.*, 2005). A sua utilização regular nos efectivos leiteiros de ovinos é muito útil para proporcionar uma informação permanente sobre o estado sanitário dos úberes dos animais e para o controlo de MSC (Scruton, 2002). Porém, a sua utilização nos efectivos de ovinos leiteiros em Portugal não está vulgarizada.

Tabela 5: Prevalência de MSC em diferentes raças de ovelhas

Raça das ovelhas	Prevalência de MSC (%)	Referências
Poll Dorset	11,5	Watson <i>et al.</i> , 1990
Border Leicester X Merino	10	
Border Leicester X Merino Boorola	4	
Merino	4	
Karagouniko	+ frequente	Stefanakis <i>et al.</i> , 1995
Chios	- frequente	
Romanov X Altamura	29,4	Dario <i>et al.</i> , 1996
Sarda	22,7	
Comisana	19,6	
Sarda X Altamura	15,1	
Leccese	13,1	
Sarda X Leccese	11,1	
Altamura Population	8,6	
Altamura	8,5	González-Rodríguez <i>et al.</i> , 1995
Assaf	50,1	
Churra	39,8	
Castellana	34,3	Las Heras <i>et al.</i> , 1999a
Assaf	35,8	
Manchega	16,0	

O TCM é um indicador indirecto da quantidade de células somáticas no leite. O reagente TCM contém teopol, um detergente aniónico que, depois de misturado com o leite em partes iguais, lisa as células libertando o seu DNA, originando uma mistura de consistência gelatinosa. Os resultados do teste são apresentados em cinco graus semi-quantitativos que correspondem a um intervalo de valores numéricos de células somáticas: Negativo (N), suspeito ou vestigial (V), 1+ (+), 2+ (++) e 3+ (+++). Na Tabela 6 está representada a relação entre os resultados do TCM e correspondentes CCS no leite de vaca, de acordo com Radostitis *et al.* (2000).

Tabela 6: Correspondência entre resultados do TCM e CCS(Radostitis *et al.*, 2000)

TCM	CCS (células/mL de leite)
N	0 - 200 000
V	150 000 - 500 000
+	400 000 - 1 500 000
++	800 000 - 5 000 000
+++	> 5 000 000

O TCM tem também sido referido como um indicador fiável para as CCS em ovinos (Gonzalez-Rodríguez e Cármenes, 1996; Radostitis *et al.*, 2000; Simonsen e Sølverød, 2005). No entanto, a correspondência entre os resultados do TCM e a CCS em leite de ovelha apenas se encontra documentada por um estudo, em que foram observados valores semelhantes aos dos bovinos (Bain *et al.*, 2003). Porém, estes dados baseiam-se num estudo em 536 amostras de leite, das quais 460 apresentaram resultado negativo.

No presente trabalho, foi realizado um rastreio de mastites em 18 efectivos ovinos explorados para a produção de leite, para conhecer a prevalência de mastites e identificar os microrganismos mais frequentemente envolvidos neste processo.

Tendo sido incluídos no estudo, rebanhos ordenhados manualmente e rebanhos sujeitos a ordenha mecânica, foi avaliada a influência do sistema de ordenha sobre a prevalência de mastites.

Foram comparadas ovelhas de cinco raças puras, mantidas em condições de exploração e manejo semelhantes, incluindo o manejo de ordenha, para averiguar a influência da raça sobre a prevalência de MSC.

Os resultados do TCM foram comparados com os resultados das respectivas análises bacteriológicas, para avaliar a utilização do TCM como indicador de infecção intramamária em ovelhas e para detectar a existência de alguma relação entre a etiologia da mastite e a intensidade da reacção inflamatória na glândula mamária ovina.

2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 – População em estudo e amostragem

O presente estudo decorreu entre 1996 e 2000 e incidiu sobre 18 efectivos de ovinos utilizados para a produção de leite, mantidos em explorações de regime extensivo, no distrito de Évora, Alentejo. Os rebanhos integram ovelhas das raças puras Awassii, Lacaune, Merino Alemão, Merino Espanhol, Merino Regional Branco, Merino Regional Preto, Serra da Estrela Branco e Serra da Estrela Preto, e ovelhas resultantes de cruzamentos da raça Awassii com Saloio, Merino Regional e outras raças. Em 5 das explorações a ordenha é processada manualmente, sendo mecânica nas restantes 13 explorações (Tabela 7).

Amostragem para detecção da prevalência de mastites

Foram identificadas todas as metades mamárias com mastite clínica com base na sintomatologia evidenciada, sintomas inflamatórios ao nível do úbere e/ou alteração do aspecto do leite.

A detecção de mastite subclínica foi realizada, através do teste californiano de mastites, a uma amostra representativa de animais escolhidos aleatoriamente dentro de cada efectivo. Com base no número de ovelhas em lactação em cada efectivo, foi calculado o tamanho da amostra necessária para o estudo da prevalência de MSC com recurso ao programa “Win Episcopo 2.0”. Como a prevalência era desconhecida, assumiu-se um valor de 50%, com um nível de confiança de 95% e um erro igual ou inferior a 10%. Num total de 4 082 ovelhas em lactação, foram submetidas ao TCM 1 868 animais.

Em 4 dos 18 efectivos, não foi possível recolher uma amostra representativa segundo os parâmetros referidos. No entanto, as amostras recolhidas destes efectivos foram analisadas. Com base na prevalência encontrada para cada rebanho, foi determinado *a posteriori* o erro absoluto relativamente ao número de amostras colhidas, para um nível de confiança de 95%. Assim, 3 rebanhos foram excluídos para o cálculo da prevalência de MSC.

Na Tabela 7 está discriminado, para cada efectivo, o sistema de ordenha utilizado, a(s) raça(s) de animais existente(s), o número de animais em lactação, o tamanho necessário para a amostra representativa, o número de animais sujeitos a TCM e o número de amostras de leite colhidas para análises bacteriológicas.

Tabela 7: Caracterização dos efectivos estudados

Tipo de ordenha, raça, nº de animais em lactação, amostra necessária, nº de animais sujeitos a TCM e nº de amostras de leite para análises bacteriológicas

Efectivo	Ordenha	Raça	Animais em lactação	Amostra necessária*	Animais sujeitos a TCM	Amostras para bacteriol.
1	Mecânica	Awassii cruzada	246	70	40	26
2	Mecânica	Awassii	230	68	73	30
3	Mecânica	Merino X Saloia X Awassii	154	60	106	28
4	Mecânica	Merino branco			50	9
		Merino preto			34	17
		Serra da Estrela branco			43	9
		Serra da Estrela preto			23	3
		Lacaunne			57	30
		Merino alemão			1	
		Merino espanhol			1	
		TOTAL	215	67	209	68
5	Manual	Merino branco	390	78	88	6
6	Mecânica	Assaf	95	48	93	10
7	Manual	Merino branco	460	80	185	3
8	Manual	Merino preto	560	82	204	2
9	Mecânica	Assaf X Manchega	500	81	192	17
10	Manual	Merino branco	297	73	113	4
11	Mecânica	Merino X Saloia X Lacaunne	220	67	161	19
12	Manual	Serra da Estrela X Awassii	50	33	26	0
13	Mecânica	Lacaunne	37	27	37	31
14	Mecânica	Saloia	146	58	146	35
15	Mecânica	Lacaunne	40	29	40	36
16	Mecânica	Lacaunne cruzada	200	65	48	40
17	Mecânica	Lacaunne	62	38	62	36
18	Mecânica	Lacaunne X Israelita (Assaf?)	180	63	45	23
TOTAL			4 082	1 087	1 868	414

* Para uma prevalência de 50%, erro de 10% e intervalo de confiança de 95%

2.2.2 – Teste Californiano de Mastites

Para detectar a presença de MSC, foi realizado o teste californiano de mastites às duas metades mamárias de cada uma de 1 868 ovelhas. O primeiro jacto de leite de cada glândula foi recolhido para cada um de 2 receptáculos de um dispositivo

apropriado para o teste, vulgarmente designado por “raquete” (Fig. 1). Foi acertada a quantidade de leite a cerca de 2 mL, aos quais foram adicionados aproximadamente 2 mL de reagente TCM (Eimermarcher, Alemanha). Depois de homogeneizada a mistura, foi lida a reacção e interpretada de acordo com a Tabela 8 adaptada de Giesecke *et al.* (1994).

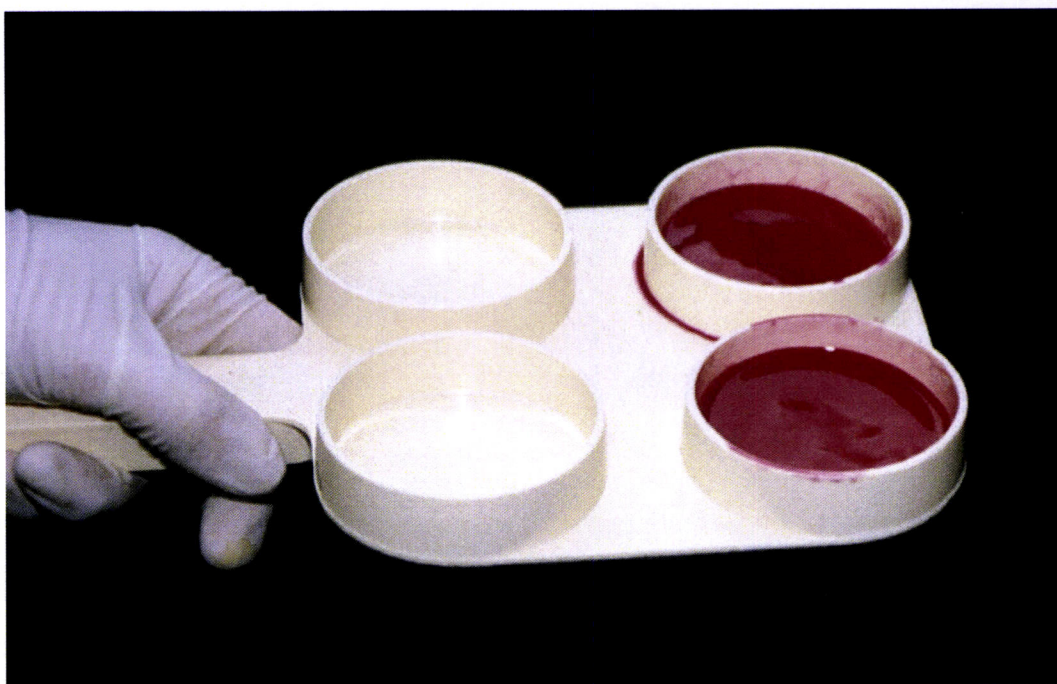


Figura 1: Teste Californiano de mastites

Tabela 8: Interpretação do TCM(adaptada de Giesecke *et al.*, 1994)

Resultado	Reacção	Descrição
N	Negativo	Ao exercer o movimento circular à raquete, a mistura continua líquida, sem formação de gel. Quando se inclina a raquete, a mistura escorre, evidenciando uma camada fina e homogénea no fundo da cavidade.
V	Vestigial	Semelhante à reacção N, mas quando se inclina a raquete a mistura apresenta-se ligeiramente mais espessa.
+	Positivo (fraco)	Durante o movimento circular, a reacção pode parecer N ou V. Quando se inclina a raquete, a mistura apresenta-se com consistência viscosa, deixando uma cauda que escorre mais lentamente. Por vezes, esta reacção desaparece com o movimento continuado da raquete.
++	Positivo	Após os primeiros dois ou três movimentos, é notória a formação de gel. Geralmente, uma porção da mistura tende a acumular-se no centro da cavidade, continuando a restante a circular na periferia. Quando se pára o movimento, a mistura gelatinosa volta a nivelar-se cobrindo regularmente o fundo. Quando se inclina a raquete, é possível verificar que a mistura está bastante gelatinosa, por vezes parece desenhar riscas e deixa uma cauda bem desenhada.
+++	Positivo (forte)	Com os dois primeiros movimentos, a mistura torna-se gelatinosa e tende a acumular-se no centro da cavidade, formando uma elevação. Quando se pára, a mistura pode nivelar, mas a superfície continua irregular e, geralmente, mantém o centro mais elevado.

TCM para estudo da prevalência de MSC

Para o estudo da prevalência de MSC, amostras de leite de 1 749 ovelhas, pertencentes a 15 rebanhos, foram submetidas ao TCM. Todas as amostras que revelaram resultado igual ou superior a V foram consideradas como provenientes de glândulas afectadas por MSC.

Para verificar se o tipo de ordenha afecta a prevalência de mastites, foram recolhidos dados de 15 explorações, com um total de 1749 animais, sendo a ordenha mecânica em 11 explorações e manual em 4. Para cada animal foi utilizada a codificação de 0 (ausência de mastite) ou 1 (mastite), de modo a que os valores médios para cada tipo de ordenha representassem a prevalência de mastite nas explorações com ordenha mecânica ou com ordenha manual.

Os dados foram estudados por análise de variância, utilizando o Proc GLM do programa SAS (SAS, 1991) e o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + O_i + e_{ij}$$

Sendo:

Y – a ocorrência de mastite na ovelha j submetida à ordenha O_i

μ – a média

O_i – o efeito do tipo de ordenha O_i

e_{ij} – o erro

TCM para estudo da influência da raça sobre a prevalência de MSC

Para verificar se a incidência de mastites difere entre as ovelhas das várias raças presentes no mesmo rebanho, utilizaram-se dados relativos a 207 ovelhas de cinco raças puras, pertencentes ao efectivo 4. Foram analisadas pelo TCM amostras de leite pertencentes a 50 ovelhas da raça Merino Branco, 34 Merino Preto, 43 Serra da Estrela Branco, 23 Serra da Estrela Preto e 57 Lacaune.

Para avaliação da incidência de mastites, a sua ocorrência foi codificada como 0 (sem mastite) ou 1 (com mastite), de modo a que os valores médios para cada raça considerada representassem a incidência de mastite nessa raça.

Os dados foram estudados utilizando a análise de variância do Proc GLM do programa SAS (SAS, 1991) e o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + R_i + e_{ij}$$

Sendo:

Y – a ocorrência de mastite na ovelha j da raça R_i

μ – a média

R_i – o efeito da raça R_i

e_{ij} – o erro

TCM como indicador de infecção intramamária

Para estudar a utilização do TCM como indicador de infecção intramamária bacteriana e avaliar qual o ponto ideal para considerar como limite entre resultado positivo e resultado negativo (*cut-off point*), foi determinada a sensibilidade (S) e a especificidade (E) do teste relativamente aos valores V, 1+, 2+ e 3+, de acordo com a Tabela 9, adaptada de Thrusfield (1999). O cálculo do valor predictivo de

um teste com resultado positivo (VPp), isto é, a percentagem de testes com resultado positivo que realmente se devem ao facto de o animal estar doente, e do valor predictivo de um teste com resultado negativo (VPn), também é referido na mesma Tabela.

Tabela 9: Determinação da sensibilidade e especificidade do TCM

(adaptada de Thrusfield, 1999)

Resultado TCM	Resultado da análise bacteriológica		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	
Sensibilidade = $a / (a+c)$ Especificidade = $d / (b+d)$		VPp = $a / (a+b)$ VPn = $d / (c+d)$	

O índice de Youden para cada valor de resultado do teste é determinado da seguinte forma (Redetzky *et al.*, 2005):

$$\text{Índice de Youden} = \text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1$$

O valor para o qual o índice de Youden for superior é o valor mais adequado para servir de ponto *cut-off*.

2.2.3 – Análises bacteriológicas

Das 36 ovelhas com MC, foram feitas colheitas de amostras aos animais que não estavam sujeitos a tratamento com agentes antimicrobianos. Foram colhidas assepticamente 27 amostras de leite para análise bacteriológica.

Dos animais com MSC, procedeu-se à colheita asséptica de leite de 414 metades mamárias, escolhidas aleatoriamente de entre as que revelaram resultado positivo no TCM (Tabela 7).

Colheita de amostras

Previamente à colheita da amostra de leite, cada teto foi cuidadosamente desinfetado com um algodão embebido em álcool a 70-80%. O mesmo algodão, depois de espremido para libertar o excesso de álcool, serviu para secar o teto. Foi utilizado um algodão diferente para cada teto.

Depois de rejeitado o primeiro jacto de leite, a amostra destinada à análise bacteriológica foi colhida para um frasco esterilizado. As amostras foram conservadas refrigeradas, numa caixa isotérmica com acumuladores de gelo, até ao seu processamento, o qual decorreu no mesmo dia da colheita.

Identificação dos agentes patogénicos

As análises bacteriológicas foram processadas de acordo com uma adaptação do método preconizado pelo National Mastitis Council (NMC, 1999). De cada amostra de leite, um volume de 0,01 mL foi inoculado por esgotamento em: uma placa de agar sangue (AS) (Blood Agar Base nº 2, Oxoid, CM271, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado), uma placa de agar MacConkey (AMC) (MacConkey Agar nº 3, Oxoid, CM115) e uma placa de agar Wilkins (AW) (Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar, Oxoid, CM619). Para a pesquisa de bactérias aeróbias estritas e facultativas, as placas de AS e AMC foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37°C durante 24 horas, seguido de um novo período de 24 horas, a 37°C, em caso de não haver crescimento no final do primeiro. As placas de AW, utilizadas para a pesquisa de bactérias anaeróbias estritas, foram incubadas em jarra de anaerobiose (Anaerocult A, Merck, 1.13829.0001), a 37°C, durante 48h. No presente trabalho não foi efectuada a pesquisa de *Mycoplasma spp.*

Foram isoladas todas as colónias presentes em número igual ou superior a 5, tendo sido registadas as características morfológicas macro e microscópicas e os resultados de provas rápidas para detecção dos enzimas catalase ou oxidase. A identificação, com base nas características bioquímicas, foi realizada com recurso aos sistemas de identificação API Staph, API 20 Strep, API 20 E, API 20 NE e API Coryne (BioMérieux).

Estudo da relação entre a etiologia e a intensidade da inflamação

Para estudar a relação entre a etiologia e a intensidade da inflamação na glândula mamária infectada, foram seleccionadas 259 glândulas mamárias das quais foram isoladas bactérias em cultura pura (Tabela 10).

Para cada glândula, foi registado o tipo de mastite, clínica ou subclínica e respectivo grau de TCM, indicador da intensidade da reacção inflamatória.

Foi avaliada a intensidade da reacção inflamatória correspondente a cada microrganismo isolado em cultura pura.

Tabela 10: Bactérias isoladas em cultura pura

Bactérias	Glândulas (N)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96
<i>Staph. xylosus</i>	39
<i>Staph. hyicus</i>	18
<i>Staph. simulans</i>	21
<i>Staph. chromogenes</i>	8
<i>Staph. warneri</i>	5
<i>Staph. aureus</i>	18
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16
<i>Enterococcus spp.</i>	14
<i>Aerococcus viridans</i>	3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	5
<i>Corynebacterium spp.</i>	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Total	259

2.3 – RESULTADOS

2.3.1 – Prevalência de mastites

Mastite clínica

Em 4 082 ovelhas em lactação, pertencentes aos 18 efectivos estudados, foram detectados 36 casos de mastite clínica, o que corresponde a uma prevalência de 0,9%.

A prevalência de MC a nível de exploração variou entre 0% e 8,1%, com um valor médio de 1,7% (Tabela 11). Não foi possível determinar a taxa de glândulas afectadas, pois esta informação nem sempre nos foi transmitida de forma discriminada.

Tabela 11: Prevalência de mastite clínica nos efectivos estudados

Efectivo	Animais em lactação	Ovelhas com MC					
		Unilateral		Bilateral		Total	
		N	%	N	%	N	%
1	246	4	1,6	6	2,4	10	4,0
2	230	6	2,6	2	0,9	8	3,5
3	154	1	ND*	ND*	ND*	3*	1,9
4	215	0	0	0	0	0	0
5	390	ND*	ND*	ND*	ND*	2*	0,5
6	95	0	0	1	1,0	1	1,0
7	460	0	0	0	0	0	0
8	560	0	0	0	0	0	0
9	500	1	0,2	0	0	1	0,2
10	297	0	0	0	0	0	0
11	220	2	0,9	0	0	2	0,9
12	50	ND*	ND*	ND*	ND*	1*	2,0
13	37	3	8,1	0	0	3	8,1
14	146	0	0	0	0	0	0
15	40	ND*	ND*	ND*	ND*	2*	5,0
16	200	1	0,5	0	0	1	0,5
17	62	ND*	ND*	ND*	ND*	1*	1,6
18	180	ND*	ND*	ND*	ND*	1*	0,6
Total	4 082	≥18	≥0,44	≥9	≥0,22	36	0,88
Média			1,2		0,4		1,7

ND – não determinado, *casos de mastite não observados, apenas comunicados, dos quais se desconhece o número de metades mamárias afectadas.

A prevalência média de MC nos 13 efectivos observados durante este estudo, sujeitos a ordenha mecânica, foi de 1,4%, tendo variado entre 0% e 8,1%. No caso dos rebanhos cuja ordenha é efectuada manualmente, a média da prevalência de MC foi de 0,2%, podendo variar entre 0% e 2,0%.

Mastite subclínica

Os resultados da pesquisa de MSC encontram-se discriminados, para as 18 explorações, na Tabela 12. Os efectivos estão ordenados de acordo com o tipo de ordenha praticado, mecânica ou manual.

Tabela 12: Prevalência de mastite subclínica a nível de exploração

Efectivo/o ordenha	Animais sujeitos a TCM	Ovelhas com MSC (TCM positivo)						Glândulas afectadas	
		Unilateral		Bilateral		Total		N	%
		N	%	N*	%*	N	%		
1/mec.	40	9	22,5	28	70,0	37	92,5	65	81,3
2/mec.	73	12	16,4	35 (+5)	47,9 (54,8)	52	71,2	87	59,6
3/mec.	106	27	25,5	21 (+1)	19,8 (20,8)	49	46,2	70	33,0
4/mec.	209	45	21,5	44	21,1	89	42,6	133	31,8
6/mec.	93	10	10,8	1	1,1	11	11,8	12	6,5
9/mec.	192	9	4,7	6	3,1	15	7,8	21	5,5
11/mec.	161	16	9,9	2 (+1)	1,2 (1,9)	19	11,8	21	6,5
13/mec.	37	9	24,3	10 (+2)	27,0 (32,4)	21	56,8	31	41,9
14/mec.	146	27	18,5	21	14,4	48	32,9	69	23,6
15/mec.	40	10	25,0	13	32,5	23	57,5	36	45,0
16/mec.*	48	7	14,6	16 (+1)	33,3 (35,4)	24	50,0	40	41,7
17/mec.	62	10	16,1	13	21,0	23	37,1	36	29,0
18/mec.*	45	11	24,4	6	13,3	17	37,8	23	25,6
Total parcial	1159	184	15,9	194 (203)	16,7 (17,5)	387	33,4	581	25,1
Média parcial			17,7		23,6 (24,8)		42,6		33,1

5/man.	88	4	4,5	3	3,4	7	8,0	10	5,7
7/man.	185	3	1,6	0	0	3	1,6	3	0,8
8/man.	204	2	1,0	0	0	2	1,0	2	0,5
10/man.	113	4	3,5	0	0	4	3,5	4	1,8
12/man.*	26	0	0	0	0	0	0	0	0
Total parcial	590	13	2,2	3	0,5	16	2,7	19	1,6
Média parcial			2,7		0,9		3,5		2,2

* Número amostrado inferior ao necessário, pelo que não foi considerado para o cálculo da prevalência

Total	1749	197	11,3	197 (206)	11,3 (11,8)	403	23,0	600	17,2
Média			13,7		17,5 (18,4)		32,2		24,8

(entre parêntesis) número / % de ovelhas com MSC em uma metade e MC na outra metade.

Nos efectivos 1, 16, 18 e 12 não foi possível recolher o número de amostras necessárias para um nível de confiança de 95% e um erro igual ou inferior a 10%, assumindo uma prevalência 50%. No entanto, a análise posterior revelou que no efectivo 1 a amostra recolhida foi representativa, em função da prevalência encontrada (Tabela 13). Assim, para o cálculo da prevalência de MSC, foram consideradas apenas 15 explorações.

Tabela 13: Prevalência de MSC nos 18 efectivos

para cálculo do erro absoluto, para um nível de confiança de 95%

Efectivo	Animais em lactação	Animais sujeitos a TCM	Prevalência de MSC encontrada	Erro absoluto
1	246	40	92,5	7,47
2	230	73	71,2	8,58
3	154	106	46,2	5,3
4	215	209	42,6	1,12
5	390	88	8	4,99
6	95	93	11,8	0,95
7	460	185	1,6	1,4
8	560	204	1	1,09
9	500	192	7,8	2,89
10	297	113	3,5	2,67
11	220	161	11,8	6,44
12	50	26	0	NA
13	37	37	56,8	0
14	146	146	32,9	0
15	40	40	57,5	0
16	200	48	50	12,33
17	62	62	37,1	0
18	180	45	37,8	12,27

De uma amostra de 1 749 ovelhas, 403 reagiram positivamente ao TCM em uma ou as duas metades mamárias, o que corresponde a uma prevalência global de MSC de 23,0%. Destas, 197 (11,3%) apresentaram apenas uma das metades mamárias afectada, o mesmo número exibiu MSC bilateral e 9 animais (0,4%) revelaram uma metade com MSC e a outra com MC (Tabela 12).

Os valores da prevalência nos diferentes efectivos situaram-se entre 1% e 92,5%, com uma média de 32,2% para as ovelhas, tendo a média de glândulas afectadas sido de 24,8%, com valores entre 0,5% e 81,3% (Tabela 12).

Tabela 14: Efeito do tipo de ordenha na incidência de mastites

Médias ajustadas, erro padrão, coeficiente de determinação, desvio padrão residual e nível de significância

Tipo de ordenha	N	LSM ± EP
Manual	590	0.027 ± 0.016
Mecânica	1159	0.332 ± 0.012
	R²	0.118
	DPR	0.395
	P	<0.0001 ***

Nas 11 explorações em que a ordenha era feita mecanicamente, a prevalência média de MSC foi de 42,6%, com valores entre 7,8% e 92,5%, tendo correspondido a uma média de 33,1% de glândulas afectadas. Nos 4 efectivos ordenhados manualmente, a prevalência média de MSC, foi de 3,5%, com valores situados entre 1,0% a 8,0% e a prevalência média de glândulas afectadas foi de 2,2% (Tabela 12, Gráfico 1).

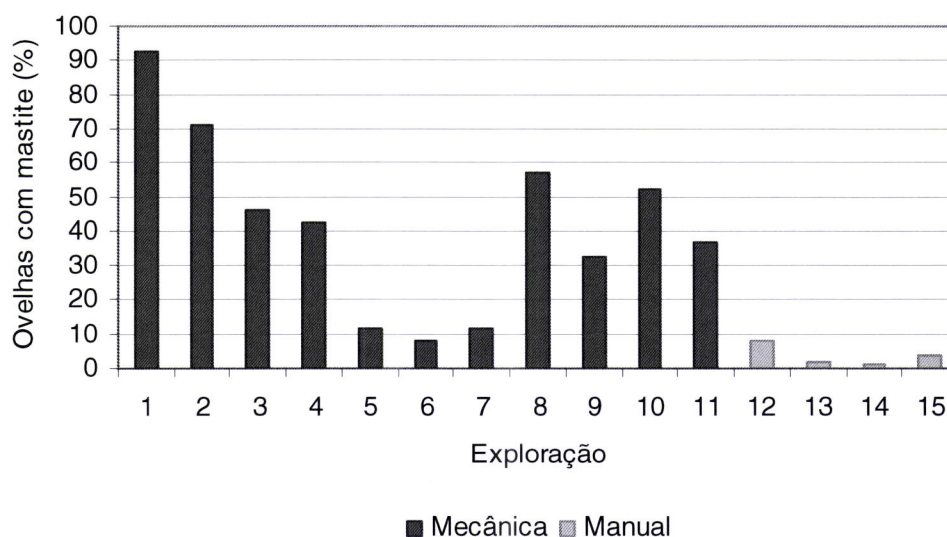


Gráfico 1: Prevalência de MSC em efectivos ordenhados mecânica e manualmente

De acordo com a análise de variância efectuada, as diferenças de prevalência encontradas entre as explorações ordenhadas mecânica e manualmente são significativas (Tabela 14). No entanto, não foram detalhadas as causas desta diferença.

Influência da raça sobre a prevalência de MSC

A prevalência de MSC no efectivo 4 foi analisada em função das cinco raças puras de ovelhas que o integram. Os valores obtidos para as diferentes raças são distintos (Tabela 15). As ovelhas da raça Lacaunne, cujos valores foram mais elevados, revelaram uma prevalência de 52,6% e uma taxa de glândulas afectadas de 41,6%. As taxas mais baixas foram exibidas pelos animais da raça Merino Branco, 28% de ovelhas com MSC e 21,2% de glândulas positivas.

Tabela 15: Prevalência de MSC no efectivo 4

Raça	Nº ovelhas	MSC / ovelhas			Nº glândulas	TCM / glândulas				
		Unil	Bilat	Total		V	+	++	+++	Total
Lacaunne (N) (%)	57	13 22,8	17 29,8	30 52,6	113	2 1,8	18 15,9	14 12,4	13 11,5	47 41,6
Merino Br (N) (%)	50	7 14,0	7 14,0	14 28,0	99	1 1,0	8 8,1	10 10,1	2 2,0	21 21,2
Merino Pr (N) (%)	34	8 23,5	7 20,6	15 44,1	67	0 0	9 13,4	6 9,0	7 10,4	22 32,8
S Estrela Br (N) (%)	43	11 25,6	9 20,9	20 46,5	86	10 11,6	10 11,6	6 7,0	3 3,5	29 33,7
S Estrela Pr (N) (%)	23	6 26,1	4 17,4	10 43,5	46	1 2,2	2 4,3	10 21,7	1 2,2	14 30,4
Total (N) (%)	207	45 21,7	44 21,3	89 43,0	411	14 3,4	47 11,4	46 11,2	26 6,3	133 32,4

Br – branco; Pr - preto

No entanto, as diferenças encontradas não são significativas, de acordo com a análise de variância efectuada (Tabela 16).

Tabela 16: Efeito da raça na incidência de mastites

Médias ajustadas, erro padrão, coeficiente de determinação, desvio padrão residual e nível de significância

Raça	N	LSM ± EP
Lacaunne	57	0.526 ± 0.065
Merino Branco	50	0.280 ± 0.070
Merino Preto	34	0.441 ± 0.084
Serra da Estrela Branco	43	0.465 ± 0.085
Serra da Estrela Preto	23	0.435 ± 0.103
	R²	0.034
	DPR	0.493
	P	0.138 NS

2.3.2 – Utilização do TCM como indicador de infecção intramamária bacteriana

Nas 413 análises bacteriológicas realizadas as amostras de leite recolhidas de animais com reacção positiva ao TCM, foram isolados agentes microbianos a partir de 53,1% dos leites cuja reacção foi suspeita ou vestigial V, de 82,5% de reacção 1+, de 72,0% de reacção 2+ e de 85,8% de leites que revelaram uma reacção 3+. Foram feitas análises bacteriológicas a 10 amostras de leite que reagiu negativamente ao TCM, tendo os resultados sido negativos para todas as amostras (Tabela 17). A informação detalhada sobre cada efectivo é apresentada na Tabela I (Anexo I).

Tabela 17: Relação entre os resultados do TCM e respectivas análises bacteriológicas

Resultado do TCM	Análises realizadas	Análises Positivas		Análises negativas	
		n	%	n	%
N	10	0	0	10	100
V	64	34	53,1	30	46,9
+	97	80	82,5	17	17,5
++	118	85	72,0	33	28,0
+++	134	115	85,8	19	14,2

Os valores da sensibilidade e especificidade do TCM obtidos, considerando diferentes resultados da reacção da prova como limite entre resultado positivo e resultado negativo (*cut-off point*), são apresentados na Tabela 18, tal como os respectivos valores predictivos para um teste positivo e um teste negativo.

Tabela 18: Sensibilidade e susceptibilidade do TCM para diferentes *cut-off points*

Ponto limite (“cut-off”)	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	VPp	VPn
V	1	0,25	0,53	1
+	0,7	0,7	0,82	0,54
++	0,43	0,63	0,72	0,33
+++	0,37	0,83	0,86	0,31

O índice de Youden mais elevado é de 0,4 e corresponde ao valor 1+ do TCM.

2.3.3 – Microrganismos isolados

Mastite clínica

Das 27 amostras de leite recolhidas a partir de metades mamárias afectadas com MC, 5 foram negativas e das restantes 22 resultaram 28 isolados de bactérias identificadas como agentes etiológicos desta afecção. Doze isolados (42,9%) foram identificados como espécies de *Staphylococci* coagulase negativos (Tabela 19; Tabela II, Anexo I), dos quais 4 se encontravam presentes em cultura mista (Tabela 20). De entre os 12 isolados referidos, 7 (25%) pertenciam à espécie *Staph. epidermidis*, 2 destas em cultura mista, com *Staph. aureus* e *Strep. equinus (bovis)*, respectivamente (Tabela 20). Cinco isolados correspondiam a estirpes de *Staph. aureus* (17,9% do total), 3 dos quais em cultura mista (Tabela 20). O terceiro agente de MC mais representativo neste estudo foi

Arcanobacterium pyogenes, isolado 4 vezes (14,3%), apenas uma destas em cultura mista (Tabela 20).

Tabela 19: Bactérias isoladas de amostras de leite de animais com MC

Bactérias	Total	% (total)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	25,0
<i>Staph. xylosus</i>	1	3,6
<i>Staph. hyicus</i>	1	3,6
<i>Staph. simulans</i>	1	3,6
<i>Staph. lentus</i>	1	3,6
<i>Staph. sp.</i>	1	3,6
SCN	12	42,9
<i>Staph. aureus</i>	5	17,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	7,1
<i>Strep. dysgalactiae</i>	1	3,6
<i>Strep. equinus (bovis)</i>	1	3,6
<i>Strep. adjacens</i>	1	3,6
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	4	14,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	3,6
<i>Proteus sp.</i>	1	3,6
Total	28	100

Na Tabela 20 são apresentadas as associações microbianas encontradas em amostras de leite de ovelhas com MC. Qualquer destas infecções mistas foi encontrada apenas uma vez. De um total de 6, 5 foram detectadas no mesmo efectivo (Tabela III, Anexo I).

Tabela 20: Bactérias isoladas em cultura mista de amostras de leite de animais com MC

Associações bacterianas	Total
<i>Staph. aureus + Staph. epidermidis</i>	1
<i>Staph. aureus + Staph. hyicus</i>	1
<i>Staph. aureus + Strep. dysgalactiae</i>	1
<i>Staph. epidermidis + Strep. equinus</i>	1
<i>Staph. xylosus + A. pyogenes</i>	1
<i>Strep. agalactiae + Strep. adjacens</i>	1
Total de infecções mistas	6

Mastite subclínica

Foram obtidos 355 isolados de bactérias a partir das amostras de leite de glândulas mamárias com MSC. Na Tabela 21 está discriminado, para cada espécie bacteriana, o número de amostras de que foi isolada e a respectiva percentagem em relação ao número total de microrganismos isolados. Esta informação, discriminada por efectivo, é apresentada na Tabela IV (Anexo I).

Das bactérias isoladas, 249 foram identificadas como espécies de SCN, representando 70,1% dos agentes etiológicos de MSC nos animais estudados. Destes, 108 isolados foram identificadas como *Staph. epidermidis*, representando 43,4% dos SCN e 30,4% do total de bactérias isoladas (Tabela 21). Os agentes de mastite infecciosa *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram isolados 22 vezes (6,2%) e 15 vezes (4,2%), respectivamente.

Das amostras de leite recolhidas a metades mamárias afectadas com MSC, 42 revelaram a presença de infecções mistas. As associações bacterianas encontradas são apresentadas na Tabela 22. A associação *Staph. epidermidis* com *Staph. xylosus* foi encontrada 5 vezes, enquanto nenhuma das restantes associações foi detectada mais do que 2 vezes. A distribuição das diferentes associações bacterianas por exploração é apresentada na Tabela V (Anexo I).

Tabela 21: Bactérias isoladas de amostras de leite de animais com MSC

Bactérias	TOTAL	% (total)	% (SCN)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	108	30,4	43,4
<i>Staph. xylosus</i>	58	16,3	23,3
<i>Staph. hyicus</i>	23	6,5	9,2
<i>Staph. simulans</i>	23	6,5	9,2
<i>Staph. chromogenes</i>	10	2,8	4,0
<i>Staph. warneri</i>	6	1,7	2,4
<i>Staph. lentus</i>	6	1,7	2,4
<i>Staph. capitis</i>	4	1,1	1,6
<i>Staph. sciuri</i>	3	0,8	1,2
<i>Staph. cohnii</i>	2	0,6	0,8
<i>Staph. hominis</i>	2	0,6	0,8
<i>Staph. caprae</i>	2	0,6	0,8
<i>Staph. sp.</i>	2	0,6	0,8
SCN	249	70,1	100
<i>Staph. aureus</i>	22	6,2	
<i>Staph. intermedius</i>	1	0,3	
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0,3	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15	4,2	
<i>Strep. equinus (bovis)</i>	3	0,8	
<i>Strep. acidominimus</i>	2	0,6	
<i>Strep. equi zooepidemicus</i>	1	0,3	
<i>Strep. mitis</i>	1	0,3	
<i>Strep. suis</i>	1	0,3	
<i>Strep. sp.</i>	1	0,3	
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	3,4	
<i>Enteroc. faecium</i>	2	0,6	
<i>Enteroc. durans</i>	2	0,6	
<i>Aerococcus viridans</i>	5	1,4	
<i>Lactococcus lactis</i>	2	0,6	
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	0,6	
<i>C. jeikeium</i>	5	1,4	
<i>C. glucoronolyticum</i>	6	1,7	
<i>C. accolens</i>	1	0,3	
<i>C. striatum-amycolatum (gr.F2)</i>	2	0,6	
<i>Corynebacterium sp.</i>	4	1,1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	2,3	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	0,3	
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,3	
<i>Escherichia coli</i>	2	0,6	
<i>Serratia marcescens</i>	2	0,6	
<i>Enterobacter sp.</i>	1	0,3	
Total	355	100	

Tabela 22: Bactérias isoladas em cultura mista de amostras de leite de animais com MSC

Associações bacterianas	Total
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. xylosus</i>	1
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. chromogenes</i>	1
<i>Staph. aureus</i> + <i>Strep. equinus (bovis)</i>	2
<i>Staph. aureus</i> + <i>C. glucoronolyticum</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. xylosus</i>	5
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. hyicus</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. simulans</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. warneri</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. lentus</i>	2
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. capitis</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Strep. acidominimus</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Strep. mitis</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>E. coli</i>	1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>C. jeikeium</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. hyicus</i>	2
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. chromogenes</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. warneri</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. cohnii</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. hominis</i> + <i>Corynebacterium sp.</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. caprae</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Staph. sp.</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Strep. sp.</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>C. glucoronolyticum</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>C. accolens</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>C. sp.</i>	1
<i>Staph. xylosus</i> + <i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Staph. hyicus</i> + <i>Staph. simulans</i>	1
<i>Staph. hyicus</i> + <i>Staph. sp.</i>	1
<i>Staph. simulans</i> + <i>Strep. acidominimus</i>	1
<i>Staph. lentus</i> + <i>Staph. sciuri</i>	1
<i>Staph. lentus</i> + <i>C. jeikeium</i> + <i>C. gluc-seminalis</i>	1
<i>Staph. sciuri</i> + <i>Aeroc. viridans</i> + <i>C. gluc-seminalis</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Aerococcus viridans</i>	1
<i>C. gluc-seminalis</i> + <i>C. striatum/amycolatium</i>	1
Total de infecções mistas	42

Não foi possível isolar bactérias anaeróbias estritas a partir das amostras recolhidas.

2.3.4 – Relação entre etiologia e intensidade da inflamação

A relação entre a intensidade da reacção inflamatória, avaliada de acordo com a reacção ao TCM ou a presença de MC, e o respectivo microrganismo isolado está indicada na Tabela 23. São referidas nesta Tabela apenas as espécies isoladas em cultura pura. A mesma informação relativa aos restantes microrganismos isolados neste trabalho é apresentada nas Tabelas VI e VII (Anexo I).

Tabela 23: Relação entre o microrganismo isolado e tipo de mastite

Microrganismo	N	Reacção inflamatória									
		V		1+		2+		3+		MC	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Staph. epidermidis</i>	96	6	6,3	22	22,9	27	28,1	36	37,5	5	5,2
<i>Staph. xylosus</i>	39	4	10,3	13	33,3	12	30,8	10	25,6		
<i>Staph. hyicus</i>	18	2	11,1	6	33,3	3	16,7	7	38,9		
<i>Staph. simulans</i>	21			5	23,8	7	33,3	8	38,1	1	4,8
<i>Staph. chromogenes</i>	8					3	37,5	5	62,5		
<i>Staph. warneri</i>	5	1	20	1	20	2	40	1	20		
<i>Staph. aureus</i>	18					4	22,2	12	66,7	2	11,1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16	1	6,3	3	18,8	5	31,3	6	37,5	1	6,3
<i>Enterococcus spp.</i>	14	2	14,3	4	28,6	5	37,7	3	21,4		
<i>Aerococcus viridans</i>	3							3	100		
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	5							2	40	3	60
<i>Corynebacterium spp.</i>	7	1	14,3	4	57,1	1	14,3	1	14,3		
<i>Pseudom. aeruginosa</i>	9	1	11,1	1	11,1	3	33,3	3	33,3	1	11,1

O padrão de resultados obtidos para cada agente etiológico está representado no Gráfico 2. Verifica-se que as infecções por *Arcanobacterium pyogenes* (N=5) induziram a resposta inflamatória mais exuberante, tendo provocado 40,0% de reacções 3+ e 60% de mastites clínicas. Seguiu-se-lhe *Staphylococcus aureus* (N=18) que originou 22,2% de reacções 2+, 66,7% de reacções 3+ e 11,1% de MC. Os agentes etiológicos *Streptococcus agalactiae* (N=16) e *Pseudomonas aeruginosa* (N=9) revelaram um padrão de indução de inflamação relativamente semelhante.

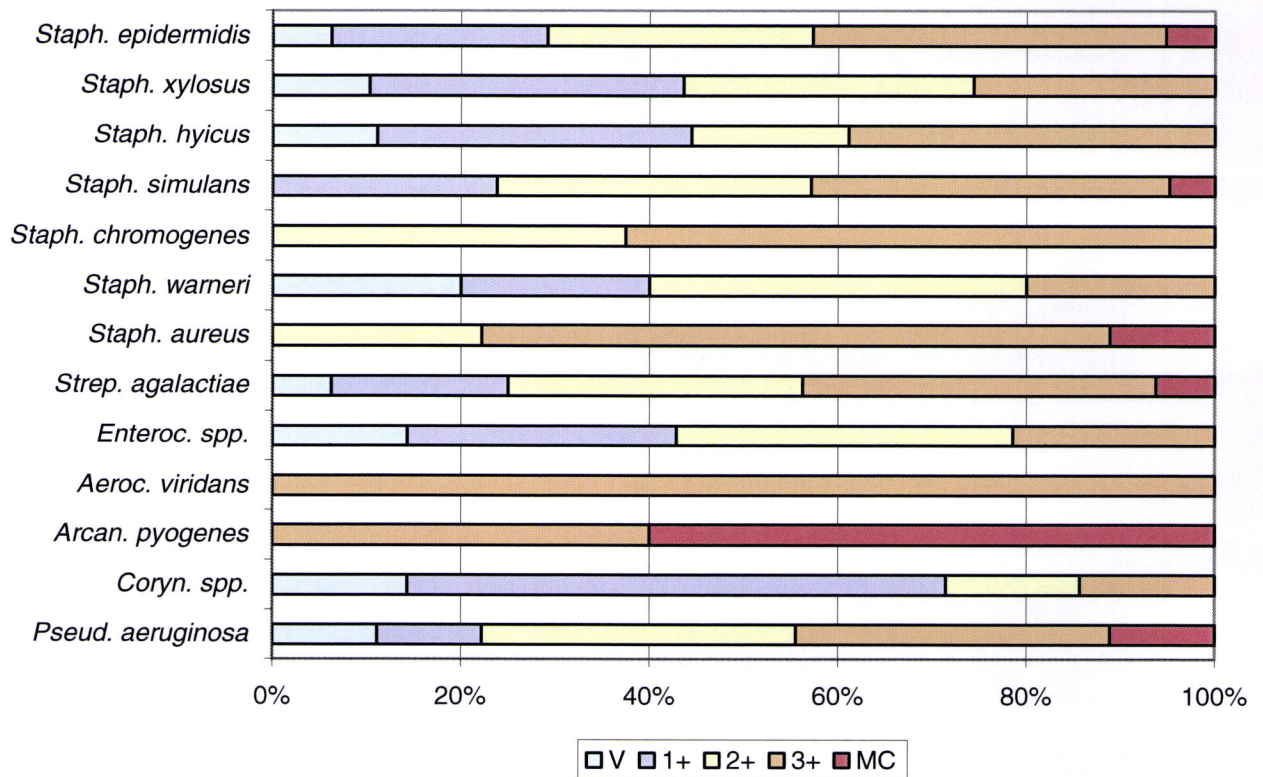


Gráfico 2: Relação entre a intensidade da reacção inflamatória e o microrganismo responsável

Das diferentes espécies de SCN representadas, *Staph. chromogenes* (N=8) não foi responsável por casos de MC, mas induziu 37,5% de reacções 2+ e 62,5% de reacções 3+. A espécie *Staph. simulans* (N=21) produziu 4,8% de MC, mas também ocasionou reacções inflamatórias mais ligeiras, TCM 1+, em 23,8% dos casos. Um padrão algo semelhante a este foi manifestado por *Staph. epidermidis* (N=96) que provocou 5,2% de MC, mas também produziu reacções V em 6,3% dos casos. As espécies *Staph. hyicus* (N=18) e *Staph. xylosus* (N=39) exibiram padrões parecidos, não tendo provocado casos de MC e com percentagens de reacção V ao TCM entre 10 e 11. A espécie *Staph. warneri* (N=5) apresentou um padrão que se aproxima dos padrões apresentados por *Staph. hyicus* e *Staph. xylosus*, mas é mais próximo do exibido pelas espécies de *Enterococci* (N=14), que induziram 14,3% de reacções V, 28,6% de reacções 1+, 37,7% de reacções 2+ e 21,4% de reacções 3+.

Apesar de ter sido isolado apenas 3 vezes em cultura pura, *Aerococcus viridans* produziu reacções inflamatórias marcadas, tendo apresentado o resultado 3+ para todos os 3 isolados.

As espécies de *Corynebacterium* (N=7) revelaram menor poder para induzir inflamação do que os restantes agentes etológicos, tendo mais de 70% dos isolados produzido reacções V e 1+. Em todas as 11 situações em que estes microrganismos estiveram implicados em infecções mistas, produziram também reacções de fraca intensidade, V ou 1+, respectivamente 9 casos e 2 casos (Tabela VII, Anexo I).

2.4 – DISCUSSÃO

A detecção de mastite clínica baseou-se na observação do úbere e do leite para detecção de sintomas e/ou alterações do aspecto do leite.

Para a detecção de mastite subclínica, o teste californiano de mastites foi utilizado como teste presuntivo, visto que é um indicador indirecto da quantidade de células somáticas no leite, as quais ao estarem aumentadas, indicam que há inflamação na glândula mamária, portanto mastite. O TCM é considerado um indicador fiável da quantidade de células somáticas e do nível de inflamação no leite de ovelha (Radostits *et al.*, 2000), tendo mostrado uma alta correlação, quando os seus resultados foram comparados com os resultados de contagens de células somáticas efectuadas num contador electrónico Fossomatic, para bovinos (Simonsen e Sølverød, 2005) e para diferentes raças de ovelhas (González-Rodríguez e Cármenes, 1996). Além disso, este teste tem a vantagem de poder ser executado junto do animal, sem necessidade de recorrer ao laboratório.

No presente trabalho foram consideradas positivas todas as reacções iguais ou de grau mais elevado que o grau V do TCM. A decisão sobre a utilização deste valor como valor *cut-off* baseou-se no facto de o valor V indicar uma CCS entre 150 e 500 X 10³ células/mL (Radostits *et al.*, 2000) e de, apesar de não haver consenso sobre este valor, Paape e colaboradores (2001) declararem que em ovelhas livres de infecção intramamária a CCS varia entre 10 e 200 X 10³ células/mL de leite.

O estudo da prevalência de MC e de MSC, aqui apresentado, refere-se a uma prevalência pontual (Stone *et al.*, 1999), isto é, os valores apresentados para cada efectivo, referem-se à prevalência no momento da colheita de amostras.

Os resultados revelaram uma prevalência média de mastites clínicas de 1,7%, com valores compreendidos entre 0% e 8,1%. Estes valores são inferiores aos referidos na bibliografia consultada. Porém, as referências relativas a prevalência pontual de MC citam casos de surtos de MC com taxas de prevalência elevadas,

atingindo valores da ordem de 10%, no caso de mastite causada por *Actinobacillus lignieresii* (Laws e Elder, 1969), 19% para MC produzida por *Pseudomonas aeruginosa* (Las Heras *et al.*, 1999b), 20% quando provocada por *Staphylococcus aureus* (Radostits *et al.*, 2000), 22% sendo devida a *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (Las Heras *et al.*, 2002).

A prevalência anual de MC em ovelhas é variáveis, apresentando valores médios entre 2% e 6,8%, sendo a prevalência em ovelhas em pastoreio geralmente inferior à prevalência em ovelhas estabuladas (Jones, 1991; Larsgard e Vaabenoe, 1993; Radostits *et al.*, 2000). Recentemente, um rastreo epidemiológico que estudou resultados referentes a 14 anos, refere uma incidência média de 3,1% de ovelhas por lactação (Bergonier *et al.*, 2005a).

Nos 15 efectivos considerados, a prevalência média de MSC foi de 32,2% para as ovelhas com valores, muito variáveis entre os diversos rebanhos, situados entre 1% e 92,5%. Visto que 11,3% dos animais apresentaram afecção unilateral, outros 11,3% exibiam MSC bilateral e, ainda, 9 animais revelaram uma metade atingida de MSC e a outra de MC, a taxa de glândulas mamárias afectadas com MSC revela uma média de 24,8%, variando entre 0,5% a 81,3%, conforme o rebanho.

Na bibliografia consultada são referidos valores entre 6,4% e 83% de animais com MSC e, relativamente a glândulas, as taxas mencionadas situam-se entre 3,1% e 67%. Esta enorme variedade de resultados deve-se, em parte, ao facto de nos diversos estudos serem utilizados métodos de diagnóstico de MSC diferentes e de a fase da lactação dos animais, no momento do estudo, também não ser coincidente (Bor *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990; Jones, 1991; Watkins *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1992b; Marco *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Romeo *et al.*, 1998; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; Pengov, 2001; Bio *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram uma prevalência de mastites muito superior em rebanhos ordenhados mecanicamente, relativamente a rebanhos ordenhados manualmente. Esta diferença verificou-se para MC, tendo sido mais

acentuada para os valores da prevalência de MSC. No entanto, a diferença estatisticamente significativa encontrada entre os dois tipos de explorações deverá ser cuidadosamente analisada, devido à grande variabilidade de valores de prevalência encontrados nos diversos efectivos sujeitos a ordenha mecânica. A falta de informação disponível relativamente ao genótipo das ovelhas, à fase de lactação dos animais e ao manejo de ordenha, designadamente prática de repasse manual, não permitiu atribuir as referidas diferenças ao tipo de ordenha. Torna-se, assim, necessário aprofundar este aspecto, acompanhando futuros estudos de um inquérito epidemiológico cuja análise das respostas possa contribuir para clarificar o papel dos diversos factores na prevalência de MSC.

Os registos referentes à importância do tipo de ordenha são muito variáveis. Alguns autores, à semelhança dos presentes resultados, referem contagens de células somáticas em ovelhas ordenhadas mecanicamente superiores às contagens obtidas em animais ordenhados manualmente (Marguet *et al.*, 2000). Outros não verificaram diferenças entre as prevalências de MSC referentes a efectivos ovinos ordenhados à mão e em rebanhos sujeitos a ordenha mecânica (González-Rodríguez *et al.*, 1995). Outros, ainda, mencionam maior frequência da afecção em ovelhas da raça Manchega ordenhadas à mão do que nas da mesma raça ordenhadas à máquina (Las Heras *et al.*, 1999a).

Nas ovelhas, a ordenha manual não aumenta significativamente o risco de infecção intramamária (Mavrogianni *et al.*, 2006). Porém, a ordenha efectuada mecanicamente pode afectar negativamente os tecidos do teto, reduzindo os mecanismos de defesa locais, causando maior risco de infecção do que a ordenha manual (Hamann e Stanitzke, 1990; Zecconi e Hamann, 2005) e, a longo termo, pode mesmo afectar o funcionamento do esfíncter do teto (Rainard e Riollet, 2006). O equipamento de ordenha pode ser responsável pela transmissão de microrganismos de um animal a outro, podendo esta transmissão ser passiva, quando os agentes são depositados perto do canal do teto, ou activa, quando as bactérias são forçados para o interior da glândula pela própria máquina. Além disto, o mau funcionamento ou utilização descuidada da máquina de ordenha pode provocar lesões que facilitam o início de uma infecção (Peris *et al.*, 2001). Possivelmente a utilização de ordenha mecânica em ovinos não está ainda

suficientemente ajustada. Também no início da utilização da ordenha mecânica para vacas leiteiras, a incidência e prevalência de MSC era elevadíssima (Henriques, 1969) e só com o decorrer do tempo, o aperfeiçoamento dos aparelhos e a correcção de erros de maneo foi possível diminuir esses valores (Sampimon *et al.*, 2005a).

Relativamente ao estudo sobre a influência da raça ovina na prevalência de MSC, os resultados obtidos no efectivo 4, constituído por vários núcleos puros todos submetidos às mesmas condições de exploração, revelaram diferentes taxas de prevalência de MSC para as diversas raças. No entanto, as diferenças por nós encontradas não foram estatisticamente significativas.

Vários autores referem a influência da raça sobre a taxa de prevalência de MSC nas ovelhas (Watson *et al.*, 1990; Stefanakis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c). Num estudo efectuado em 12 efectivos de ovelhas da raça Manchega, o autor salienta o facto de a taxa de prevalência ser mais elevada em ovelhas de maior produção leiteira (De La Cruz *et al.*, 1994). Este aspecto é mencionado noutros trabalhos relativamente a animais de raças diferentes. A raça de alta produção Assaf exibiu taxas de prevalência de MSC superiores a outras raças de produção inferior (González-Rodríguez *et al.*, 1995; Las Heras *et al.*, 1999a). Outro estudo refere uma taxa de prevalência de MSC para esta raça muito elevada, 55% de animais afectados (Bor *et al.*, 1989). Os resultados aqui apresentados revelaram altas taxas de prevalência de MSC em efectivos compostos de ovelhas da raça de alta produção Lacaunne. Porém, as taxas de prevalência observadas relativamente à raça Assaf, também de alta produção, não são muito elevadas, 11,8% em ovelhas puras (efectivo 6) e 7,8% em animais resultantes do cruzamento desta raça com a raça Manchega (efectivo 9). Tal poderá dever-se, eventualmente, a boas práticas de maneo sanitário e de higiene que poderão ter contribuído para que uma eventual tendência para desenvolvimento de MSC não se manifestasse.

No que respeita ao estudo sobre a utilização do teste californiano de mastites como indicador de infecção intramamária bacteriana, verificou-se que a reacção deste teste para a qual se obtém o índice de Youden mais elevado foi a reacção 1+. Se considerarmos o valor 1+ como ponto *cut-off*, os valores para a

sensibilidade (S) e para a especificidade (E) do teste serão identicamente de 0,7, valores estes que são baixos. Ao determinar como ponto limite para discriminar entre um resultado negativo e um resultado positivo, uma reacção para a qual a S é baixa corre-se o risco de obter muito falsos negativos, isto é, animais que na realidade estão infectados, originam resultado negativo. Por outro lado, se a E for baixa, muitos resultados positivos serão falsos positivos, referindo-se a animais que não estão infectados

No presente caso, ao considerar como negativas todas as glândulas mamárias cujo leite revela uma reacção abaixo de 1+, nomeadamente aquelas com reacção V, obter-se-á uma alta taxa de falsos negativos. Com efeito, 53,1% dos leites com reacção V revelaram que existia infecção intramamária, pois a análise bacteriológica foi positiva.

Las Heras e colaboradores (1999a) aconselham a utilização da reacção 1+ como valor indicador de MSC nas ovelhas, após ter obtido valores de 0,84 para a S e de 0,91 para a E. Outros autores, para o mesmo ponto limite, apresentam valores para a S e para a E de 0,46 e 0,97, respectivamente, (De La Cruz *et al.*, 1994) ou 0,73 e 0,83 (McDougall *et al.*, 2001). Num outro estudo, em que determinaram os valores da S e E do TCM, para o mesmo ponto limite, em colheitas mensais ao longo da lactação, os autores obtiveram valores para a S que variaram entre 0,29 e 0,60 e para a E entre 0,72 e 0,93 (Romeo *et al.*, 1998). A disparidade de valores referidos na bibliografia deve-se, provavelmente em parte, a variações na interpretação dos resultados do teste por diferentes operadores, verificando-se uma elevada subjectividade neste método de diagnóstico.

Quanto mais elevados forem os valores da S e da E de um teste de diagnóstico, maior a sua capacidade de predizer se os animais positivos e negativos são verdadeiramente doentes e verdadeiramente não doentes, respectivamente (Thrusfield, 1999). Apesar de o seu valor predictivo não ser muito elevado, o TCM é um teste de baixo preço e de fácil execução, que permite o diagnóstico imediato no próprio estábulo e, portanto, muito útil para controlar o estado sanitário dos úberes das ovelhas pelo produtor.

A escolha do ponto *cut-off* depende do objectivo a alcançar. Quanto mais exigente for o critério de classificação do efectivo e mais ambicioso, em termos sanitários, for o produtor, mais baixo deve considerar o ponto limite entre animais positivos e animais negativos. Os resultados deste trabalho mostraram que a utilização da reacção V como ponto limite pode eliminar os casos de falsos negativos, visto que o valor predictivo para os testes negativos foi 1. Contudo, a percentagem de falsos positivos foi de 46,9%, tendo o valor predictivo para os testes positivos sido de 0,53. No entanto, embora as análises microbiológicas tenham resultado negativas nestas amostras, é possível que alguns destes animais tivessem infecção intramamária, uma vez que alguns agentes etiológicos de mastite podem ter localização intracelular, não tendo também sido contemplada a pesquisa de *Mycoplasma spp.*, fungos e vírus.

Quanto à etiologia, os resultados do presente estudo indicaram um papel preponderante de *Staphylococci* coagulase negativos como causadores de mastites ovinas. Como causa de MC, representaram 42,9% dos microrganismos isolados e corresponderam a 70,1% das bactérias identificadas como agentes etiológicos de MSC.

A maioria dos autores refere, igualmente, espécies de SCN como mais frequentes causadores de MSC nas ovelhas (Ahmad *et al.*, 1992a; Marco *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Hofer *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Burriel, 1997; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Leitner *et al.*, 2001; Pengov, 2001; Bergonier *et al.*, 2005a). Estes resultados são muito superiores aos encontrados em bovinos. Porém, nos últimos 10 anos, espécies de SCN têm vindo a aumentar de importância tanto como agentes de MC como de MSC em bovinos (Sampimon *et al.*, 2005a; Taponem *et al.*, 2005). Diversos autores referem prevalências de MSC em vacas devidas a SCN, de 18,1% (Bexiga *et al.*, 2005b) e 34,1% (Barberio *et al.*, 2005).

Leitner e colaboradores (2001) sugerem que o úbere de ovelha tem menor resistência a este grupo de microrganismos. No entanto, a discrepância de resultados também poderá dever-se ao facto de existirem factores de virulência nas estirpes ovinas que não existem, ou são menos frequentes, nas estirpes bovinas. Estudos realizados sobre a produção de enterotoxinas por *Staph.*

aureus, revelaram que as estirpes isoladas de mastites ovinas eram mais toxinogénicas do que as isoladas de mastites bovinas (Orden *et al.*, 1992b).

As espécies identificadas neste trabalho foram *Staphylococcus epidermidis*, *Staph. xylosus*, *Staph. hyicus*, *Staph. simulans*, *Staph. chromogenes*, *Staph. warneri*, *Staph. lentus*, *Staph. capitis*, *Staph. sciuri*, *Staph. cohnii*, *Staph. hominis* e *Staph. caprae*. Com excepção de *Staph. cohnii* e *Staph. hominis*, todas as outras espécies são referidas na bibliografia consultada como agentes etiológicos de mastites em ovelhas.

De entre as espécies de SCN isoladas, destacou-se pela sua frequência *Staph. epidermidis*. Este microrganismo representou 25% dos agentes patogénicos isolados a partir de leite de animais com MC, tendo sido isolado 7 vezes, 5 das quais em cultura pura. Foi identificado como agente etiológico de MSC em 108 amostras, correspondendo a 43,4% de SCN e 30,4% do total de bactérias isoladas durante este estudo. Esta espécie revelou ser o mais frequente agente etiológico de MSC nas ovelhas em diversos rastreios (De La Cruz *et al.*, 1994; Hofer *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Pengov, 2001, Ariznabarreta *et al.*, 2002; Bergonier *et al.*, 2005a) e foi referida por Hofer e colaboradores (1995) como principal causador de MC em ovelhas. *Staph. epidermidis* é também o principal responsável por infecções duráveis (Bergonier *et al.*, 2005b).

Staphylococcus aureus é considerado o principal agente etiológico de MC nas ovelhas (Falade *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1990; Indrebø, 1990; Jones, 1991; Mavrogenis, 1995; Bergonier *et al.*, 1999; Radostiis *et al.*, 2000). No entanto, estas citações referem-se a surtos de MC com elevadas incidências que, pela sua gravidade e exuberância, chamam a atenção de produtores e investigadores. O objectivo deste trabalho foi identificar os microrganismos implicados na patologia da glândula mamária e o rastreio incidiu sobre efectivos sem problemas aparentes. Durante esta investigação, apenas foi possível recolher 27 amostras de leite de 21 ovelhas que foram encontradas com mastite clínica, das quais foram obtidos 27 isolados. Destes, apenas 5, 17,9% do total, foram identificados como *Staph. aureus*, 3 dos quais se encontravam em cultura mista.

Esta diferença na frequência de agentes etiológicos de MC no presente estudo relativamente aos resultados referidos na bibliografia pode, pois, dever-se a diferentes condições de rastreio. Se por um lado, as MC causadas por SCN têm incidências baixas, não provocando surtos apreciáveis, por outro lado, o número de casos de MC observados durante rastreios de MSC não será digno de relação, justificando a escassa bibliografia que lhes faça referência. A divergência de resultados pode, ainda, resultar da reduzida amostragem analisada neste trabalho, da disparidade de factores higiosanitários que caracterizam as diferentes explorações ou, ainda, de diferenças geoclimáticas que podem influenciar o microbismo dos efectivos animais. Um outro aspecto a tomar em consideração é o número de casos de MC em que não foi possível isolar qualquer agente microbiano (5 em 27). A eventual localização intracelular do agente etiológico pode ter influenciado os resultados.

No que respeita a MSC, *Staph. aureus* foi isolada de 22 amostras, correspondendo a 6,2% do total de agentes etiológicos de MSC. A frequência máxima desta espécie, como causador de MSC, verificou-se no efectivo 15 e foi de 12,6% (Tabela IV, Anexo I). Na bibliografia consultada são descritas baixas prevalências de *Staph. aureus* como agente causal de MSC (Watkins *et al.*, 1991; Marco *et al.*, 1993; De La Cruz *et al.*, 1994; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; Leitner *et al.*, 2001; Pengov, 2001). Esta baixa frequência contrasta com o que acontece em bovinos leiteiros, para os quais esta espécie constitui um dos principais agentes etiológicos de MSC (Bexiga *et al.*, 2005; Bolzoni *et al.*, 2005).

Leitner e colaboradores (2001) justificam a baixa prevalência de MSC nas ovelhas devidas a *Staph. aureus* como resultado de um bom maneio, caso que não se verifica nos efectivos por nós estudados. O facto, também sugerido, de as estirpes mais virulentas desta espécie serem eliminadas das explorações ao serem refugadas as ovelhas, visto frequentemente desenvolverem gangrena, parece-nos mais plausível. Ainda, a elevada prevalência de infecções intramamárias por SCN poderá constituir um obstáculo à colonização por *Staph. aureus*, quer por acção das células inflamatórias, quer por competição entre os referidos microrganismos. Já foi demonstrada a acção inibitória sobre agentes

patogénicos de mastite por parte de bactérias constituintes da flora normal da pele dos tetos, nomeadamente SCN (Woodward *et al.*, 1987; 1988).

Arcanobacterium pyogenes foi isolado a partir de 4 amostras de leite de animais com MC, tendo sido associado a MSC apenas 2 vezes, ambas em animais pertencentes ao efectivo 3 (Tabela IV, Anexo I), efectivo em que foi também detectado um caso de MC causada por este agente patogénico (Tabela II, Anexo I). Apesar de não ser frequente a ocorrência deste microrganismo como causador de mastites em ovinos, existem referências ao seu envolvimento como agente de MC (Falade *et al.*, 1988) e de MSC em ovelhas (Jones, 1991; Rapoport *et al.*, 1999).

Streptococcus agalactiae apenas provocou 2 dos casos de MC, tendo sido isolado de 1 em cultura pura e outro em associação com *Strep. adjacens*. Foi isolado a partir de 15 amostras de leite de animais com MSC, sempre em cultura pura, 12 das quais foram recolhidas a ovelhas pertencentes ao efectivo 13 (Tabela VI, Anexo I), representando 40% dos agentes de MSC nesta exploração. Além deste efectivo, onde também foi responsável por 1 caso de MC, só ocorreu em duas outras explorações, uma com 1 caso de MC e outra com 2 casos de MSC (Tabela VI, Anexo I). Na bibliografia consultada não é frequente a referência a esta espécie. Porém pode provocar MC nas ovelhas (Falade *et al.*, 1988) e, como causador de MSC, pode atingir 13,5% dos agentes patogénicos isolados (Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c). Bio e colaboradores (2005) descrevem um estudo efectuado no matadouro, em que 31% das ovelhas com MSC estavam infectadas com *Strep. agalactiae*. Os resultados do presente estudo sugerem, da mesma forma que os trabalhos referidos, que embora não se trate de um agente etiológico frequente, poderá provocar surtos de MSC. A falta de higiene durante a ordenha é responsável pela disseminação deste agente de mastite infecciosa.

Strep. equinus (bovis) foi isolado de 1 caso de MC em associação com *Staph. epidermidis*, tendo sido também identificado em 3 casos de MSC, apenas uma das vezes em cultura pura e 2 em associação com *Staph. aureus*. Este microrganismo é referido por Watkins e colaboradores (1991) como agente etiológico de MSC ovina, a qual evoluiu para a forma clínica.

Das restantes espécies de *Streptococci* isoladas neste trabalho, *Strep. dysgalactiae* foi isolado em associação com *Staph. aureus* a partir do leite de uma ovelha com MC, tendo sido já referido na bibliografia como agente etiológico de mastite ovina (Bor *et al.*, 1989; Scott, 2000); *Strep. adjacens* foi também identificado numa amostra de leite de um animal com MC em associação com *Strep. agalactiae*, não tendo sido encontrada, na bibliografia consultada, qualquer referência que relacione esta bactéria com mastite ovina.

Relativamente a MSC, as espécies de *Streptococci* isoladas durante este estudo foram *Strep. acidominimus*, a qual é referida por Ziluaga e colaboradores (1998); *Strep. zooepidemicus*, mencionado como causador de um surto de MC em ovelhas (Las Heras *et al.*, 2002); *Strep. mitis* e *Strep. suis*, as quais foram ambas isoladas em cultura pura, e não foi encontrada qualquer referência bibliográfica à sua implicação na patologia da glândula mamária ovina.

As espécies de *Enterococci* corresponderam a 4,5% dos agentes etiológicos de MSC, nos animais estudados. Destas, *Enteroc. faecalis* foi a mais representativa, correspondendo a 3,4% do total de bactérias e 18,2% dos isolados no efectivo 15 (Tabela IV, Anexo I). Esta espécie e *Enteroc. faecium*, também isolada neste trabalho, foram referidas como agentes de MSC (Watkins *et al.*, 1991). Outra espécie identificada foi *Enteroc. durans*, a qual não é referida na bibliografia consultada.

Aerococcus viridans foi isolado em 3 efectivos diferentes, a partir de um total de 5 amostras de leite de animais com MSC, representando 1,4% dos agentes etiológicos desta afecção. A referência a este microrganismo como causador de mastite em ovelhas, nomeadamente MSC, é pouco frequente, no entanto foi mencionada por Ziluaga e colaboradores (1998).

Espécies de *Corynebacteria* estiveram associadas a 18 casos de MSC, o que representa 5% dos microrganismos identificados. Destes 18 isolados, 13 provêm de amostras de animais pertencentes ao mesmo efectivo (Tabela IV, Anexo I) que, de acordo com o método de identificação utilizado, corresponderam a 4 espécies diferentes: *C. jeikeium*, *C. glucoronolyticum*, *C. accolens* e *C. striatum* ou *C. amycolatum*, visto que o método não permite discriminar estas duas espécies.

Dos restantes 4 isolados, pertencentes a 3 outros efectivos, um foi identificado como *C. jeikeium*, não tendo sido possível determinar a espécie dos restantes 3 isolados. O método de identificação utilizado neste trabalho, provavelmente, não permite identificar até à espécie, bactérias do género *Corynebacterium* isoladas de leite mastítico de ovino. Com efeito, as espécies associadas a MSC em ovelhas, *C. mastitidis* (Fernández-Garayzábal *et al.*, 1997) e *C. camporealensis* (Fernández-Garayzábal *et al.*, 1998a), não estão incluídas na base de dados do sistema “API Coryne”. Além disso, diversos autores referem-se as espécies de *Corynebacteria* causadoras de MSC em ovelhas apenas como *Corynebacterium spp.* (Watson *et al.*, 1990; De La Cruz *et al.*, 1994; Mavrogenis *et al.*, 1995; Stefanakis *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998 ; Apolo *et al.*, 1999), possivelmente por não ser fácil a identificação até à espécie. Considerando estes factos e a relativa variedade de espécies identificadas durante o presente estudo, dever-se-á pôr a hipótese de a identificação destes microrganismos não estar correcta.

Foram também identificadas como agentes etiológicos de mastite em ovinos, embora esporadicamente, algumas bactérias Gram-positivas, as quais são também raramente referidas na bibliografia, designadamente *Staphylococcus intermedius* (Las Heras *et al.*, 1999a), *Micrococcus luteus* (De La Cruz *et al.*, 1994) e *Lactococcus lactis* (Pengov, 2001).

Apenas dois casos de MC foram provocados por bactérias Gram-negativas. *Proteus sp.* foi um dos agentes patogénicos responsáveis por esta forma de mastite. Microrganismos pertencentes a este género são referidos na bibliografia consultada como agentes de mastite ovina, apenas referentes a casos de MSC (Burriel *et al.*, 1997; Ziluaga *et al.*, 1998; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c).

Pseudomonas aeruginosa foi responsável pelo outro caso de MC referido. Foi, também, isolada de 8 amostras de leite recolhido a metades mamárias afectadas com MSC, o que corresponde a 2,3% dos agentes etiológicos implicados nesta afecção. Este microrganismo distribuiu-se por 5 dos efectivos (Tabelas II e IV, Anexo I). Existem referências ao seu papel na patologia da glândula mamária ovina, tanto como agente de MC (Falade *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1990; Las Heras *et al.*, 1999b; Rapoport *et al.*, 1999), como causador de MSC (Bor *et al.*, 1989; González-Rodríguez, *et al.*, 1995; Rapoport *et al.*, 1999).

Outros microrganismos Gram-negativos associados a MSC isolados, embora com baixa frequência, foram *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter sp.*. Todos estes agentes foram anteriormente referidos como causadores de MSC ovina (Bor *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1991; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1990; Mavrogenis *et al.*, 1995; Dario *et al.*, 1996; Apolo *et al.*, 1999; Rapoport *et al.*, 1999).

A ocorrência de infecções mistas foi relativamente frequente, 42 casos de MSC e 6 de MC. Apenas 3 combinações se repetiram 2 vezes, além da associação *Staph. epidermidis* e *Staph. xylosus*, encontrada 5 vezes. Estas duas espécies de *Staphylococci* foram os microrganismos mais frequentemente isolados ao longo de todo o trabalho.

Neste estudo foi avaliada a relação entre a etiologia e a intensidade da inflamação. A reacção inflamatória que se estabelece na glândula mamária face à infecção é responsável pelo aumento da descarga de células somáticas, as quais são, principalmente, polimorfonucleares neutrófilos. O grau de positividade obtido no TCM é tanto maior quanto maior for o número de células presentes no leite. O estudo da resposta inflamatória face aos diferentes agentes etiológicos, através da análise da respectiva intensidade da reacção ao TCM, pode fornecer um padrão de resultados para cada agente etiológico que traduz, de algum modo, a sua capacidade de provocar mastite.

Além de factores inerentes ao microrganismo que provocam uma chamada de células ao local da infecção, outros factores podem influenciar a intensidade da resposta, nomeadamente o número de bactérias que atinge o tecido mamário, o estado fisiológico e imunitário da própria glândula e também a extensão da glândula que é afectada. Mesmo entre bactérias pertencentes à mesma espécie, os factores de virulência presentes podem variar de estirpe para estirpe.

Os resultados deste trabalho poderiam sugerir diferentes perfis de resposta inflamatória para diversas espécies de microrganismos. Teria sido interessante averiguar se existem diferenças significativas. Porém, o número reduzido de

dados respeitantes a alguns dos microrganismos estudados não nos permite submetê-los a um estudo estatístico.

De entre os agentes etiológicos abrangidos neste estudo, *Arcanobacterium pyogenes* induziu respostas mais exuberantes. Contrariamente, o padrão revelado face à infecção por *Corynebacterium spp.* traduziu uma indução de inflamação muito mais moderada, confirmando os resultados de outros estudos, os quais referem que as espécies de *Corynebacterium* estão associadas a elevações discretas da contagem de células somáticas (Ziluaga *et al.*, 1998).

Staphylococcus aureus, reconhecidamente patogénico para a glândula mamária de ovelha, originou inflamações notórias, que se traduziram por MC e MSC com elevados níveis de células somáticas no leite, produzindo reacções de grau 2+ e 3+ no TCM. As infecções intramamárias devidas a este agente patogénico induzem elevações da contagem de células somáticas acentuadas (González-Rodríguez *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998).

O padrão de reacções ao TCM obtido em amostras de leite provenientes de glândulas infectadas por *Streptococcus agalactiae* e por *Pseudomonas aeruginosa* são relativamente semelhantes e, tal como é referido na bibliografia, a resposta celular devido a infecções intramamárias por estes microrganismos é pronunciada (González-Rodríguez *et al.*, 1995).

As várias espécies de SCN são, por vezes, estudadas em conjunto quanto à sua influência sobre a resposta inflamatória da glândula mamária, através da análise da CCS, e os valores médios são comparados com outros grupos de microrganismos (González-Rodríguez *et al.*, 1995). Quando diferentes espécies de SCN são estudadas separadamente e comparadas entre si, são apresentados resultados variáveis. Alguns trabalhos referem uma influência semelhante relativamente às diferentes espécies (Leitner *et al.*, 2000) porém, outros descrevem efeitos que variam consoante a espécie. No entanto, as diversas referências não coincidem quanto à amplitude da resposta produzida pelas diferentes espécies (Fthenakis e Jones, 1990b; Burriel, 1997; Ziluaga *et al.*, 1998; Pengov, 2001).

De acordo com os perfis de intensidade de inflamação induzida, as distintas espécies de SCN aqui analisadas poderiam ser ordenadas, começando na espécie que maior grau de inflamação induziu, da seguinte forma: *Staph. chromogenes* → *Staph. simulans* → *Staph. epidermidis* → *Staph. hyicus* → *Staph. xylosus* → *Staph. warneri*, sendo esta a espécie menos indutora de inflamação, ou agrupá-los deste modo:

1º grupo – *Staph. chromogenes*

2º grupo - *Staph. simulans* e *Staph. epidermidis*

3º grupo - *Staph. hyicus*, *Staph. xylosus* e *Staph. warneri*

em que a espécie pertencente ao 1º grupo induz uma reacção mais exuberante e as pertencentes ao 3º grupo são as que induzem uma resposta mais moderada. Na Tabela 24 estão representados os resultados obtidos no presente estudo e a sua relação com os resultados referidos na bibliografia consultada.

Tabela 24: Grau de reacções inflamatórias causadas por SCN

Comparação dos resultados obtidos com dados de outros autores e ordenação dos SCN quanto à intensidade da inflamação que provocam na glândula mamária

Espécie de SCN	Resultados obtidos	Fthenakis e Jones, 1990b	Burriel, 1997	Ziluaga et al., 1998	Pengov, 2001
<i>Staph. chromogenes</i>	1º	1º		2º	
<i>Staph. simulans</i>	2º	2º	2º	1º	3º
<i>Staph. epidermidis</i>	3º		3º	4º	1º
<i>Staph. hyicus</i>	4º				2º
<i>Staph. xylosus</i>	5º	3º		5º	
<i>Staph. warneri</i>	6º		1º	3º	

Num ensaio em que foram inoculados experimentalmente, na glândula mamária de ovelhas de aptidão leiteira, *Staph. chromogenes* produziu MC, *Staph. simulans* causou MSC e *Staph. xylosus* foi apenas responsável por um aumento transitório da CCS (Fthenakis e Jones, 1990b). Os autores deste estudo indicaram uma ordenação destas espécies, quanto ao seu poder patogénico. Os nossos resultados sugerem uma ordenação semelhante, relativamente ao grau de reacção inflamatória induzida na glândula mamária.

Num ensaio, em que foram inoculadas experimentalmente três espécies diferentes de SCN em glândulas mamárias de ovelhas de carne, *Staph. warneri* e *Staph. simulans* produziram mais alterações na composição do leite do que *Staph. epidermidis*, tendo *Staph. warneri* também provocado sintomas moderados de MC (Burriel, 1997). Contrariamente, nos resultados obtidos no presente estudo, *Staph. warneri* influenciou menos a resposta inflamatória da glândula mamária do que todas as outras espécies estudadas. Esta discrepância de resultados pode dever-se à reduzida amostragem aqui avaliada. No entanto, poderá também considerar-se a hipótese de o poder patogénico de cada estirpe não estar tanto na dependência da espécie, mas sim da posse de factores de virulência, cuja presença varia dentro de cada espécie. Burriel (1997) refere diferentes alterações na qualidade do leite produzido por ovelhas infectadas com diferentes estirpes de *Staph. warneri*. Esta hipótese também poderá explicar a já referida discrepância de resultados apresentados pelos vários autores.

As espécies de *Enterococci*, às quais tem sido apontado um poder patogénico semelhante a *Streptococcus spp.*, produzindo elevações da CCS superiores às verificadas para SCN (Ziluaga *et al.*, 1998), revelaram um padrão de indução de inflamação menos exuberante do que os isolados de *Strep. agalactiae*, tendo-se assemelhado ao perfil exibido por *Staph. warneri*.

Não foi encontrada na bibliografia qualquer referência à influência de *Aerococcus viridans* sobre a reacção inflamatória da glândula mamária, apesar de, relativamente a MSC em bovinos, ser referida a ocorrência de *Aerococcus spp.* em cultura pura num número apreciável de quartos mamários (Devriese *et al.*, 1999). Esta bactéria foi isolada em cultura pura em apenas 3 situações, tendo sempre provocado reacção 3+. O reduzido número de amostras apenas permite sugerir que este microrganismo, embora pouco frequente, poderá ser um agente etiológico de MSC nas ovelhas com uma elevada capacidade para induzir inflamação na glândula mamária.

Os resultados do presente estudo, na sua globalidade, sugerem que, apesar de a prevalência de mastite clínica nas ovelhas ser baixa, a prevalência de mastite subclínica é bastante elevada. Este facto é indicativo de uma produtividade leiteira inferior ao potencial dos animais e de baixa qualidade do leite produzido.

De particular importância é a ocorrência de mastites causadas por microrganismos de natureza contagiosa, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, que constitui um risco para a saúde pública, e *Streptococcus agalactiae*, que pode causar surtos de MSC com alta prevalência a nível de rebanho.

No entanto, a maioria dos casos de mastites detectados foram devidos a microrganismos que integram a microbiota da pele, principalmente *Staphylococci* coagulase negativos. Assim, apenas com rigorosas medidas de manejo será possível um efectivo controlo destes agentes patogénicos. A prossecução de regras de higiene na ordenha, tal como uma rigorosa fiscalização do funcionamento e manutenção do equipamento de ordenha são fundamentais. O teste californiano de mastites deverá ser utilizado com um ponto *cut off* “V”, para uma avaliação exigente do estado sanitário dos úberes dos animais e da qualidade do leite.

3 – ESTUDO DE SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS A AGENTES ANTIMICROBIANOS

3.1 – INTRODUÇÃO

O controlo de mastites deve ter como base um rigoroso maneiho higiénico da ordenha e das instalações. Porém, actualmente, depende em grande escala do recurso à utilização de agentes antimicrobianos. Com efeito, o problema da emergência de estirpes resistentes e multirresistentes aos antibióticos e as falhas terapêuticas frequentemente observadas aquando do tratamento de mastites durante a lactação não foram suficientes para abandonar o uso destes medicamentos. Este facto justifica-se por, até à data, não se ter conseguido método alternativo que proporcione melhores resultados para o tratamento e por ser difícil implementar nas explorações um maneiho higiénico eficaz.

De entre os métodos de controlo de mastites alternativos ao uso de antibióticos, a estimulação das defesas naturais da glândula mamária tem sido objecto de estudo de muitos investigadores. A estimulação inespecífica é especialmente atractiva, dada a grande variedade de microrganismos que podem ser agentes etiológicos de infecções intramamárias. Porém, a utilização de dispositivos intramamários não confere protecção razoável (Nickerson *et al.*, 1990; Penadés *et al.*, 1993) e a administração de citoquinas ou outros factores estimulantes da resposta não específica, presentemente, não constitui alternativa satisfatória nem está vulgarizada. Por outro lado, a vacinação, através de imunização local ou sistémica, tem sido amplamente estudada e experimentada, mas apesar de se terem conseguido progressos na indução de mecanismos protectores, ainda não foi possível desenvolver uma vacinação considerada eficaz (Kehrli e Harp, 2001).

Pelas razões apontadas, o tratamento das mastites com agentes antimicrobianos continua a ser largamente utilizado, não só com fins terapêuticos como também como medida profilática, através do chamado tratamento de secagem que consiste na aplicação intramamária, ou parenteral, de medicamentos antibacterianos de longa acção, após a última ordenha do período de lactação.

Desta forma, consegue diminuir-se a incidência de infecções no período seco e de mastites clínicas no período pós-parto e, ainda, controlar infecções que não foi possível resolver durante a lactação (Radostits *et al.*, 2000).

Para tratar as mastites clínicas com sucesso e para prevenir eficazmente o desenvolvimento de novas infecções intramamárias, através do tratamento de secagem, é fundamental conhecer o padrão de susceptibilidade dos microrganismos mais prevalentes no efectivo animal. Antes da utilização de agentes antimicrobianos, deveria ser feito um teste de sensibilidade aos antibióticos, mas este é relativamente dispendioso e demorado, encarecendo os custos da terapia. Assim, a escolha do antibiótico é frequentemente empírica, correndo o risco de recair sobre um princípio activo inadequado. A disponibilidade de informação obtida em estudos de sensibilidade a antibióticos anteriormente realizados é muito útil para auxiliar na escolha do agente antimicrobiano a utilizar.

Tanto para a terapêutica como para a profilaxia de mastites, a utilização de preparações medicamentosas de aplicação intramamária é preferível à administração parenteral, devido à fraca difusão do medicamento do sangue para o leite. Exceptuam-se determinadas situações de mastite hiper-aguda, para controlar a sintomatologia sistémica, e ocasiões em que haja obstrução dos canais galactóforos, casos em que a administração parenteral está recomendada.

Existe uma variedade relativamente extensa de produtos antimicrobianos para aplicação intramamária no mercado português, os quais são indicados para utilização em bovinos. A utilização destes produtos na glândula mamária de ovinos tem sido estudada não só para fins terapêuticos como também para tratamento de secagem em ovelhas (Buswel e Barber, 1989). No entanto, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, sem prévio conhecimento sobre a sua eficácia terapêutica sobre os isolados locais, é um dos factores responsáveis pela pressão de selecção de estirpes resistentes.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade dos agentes etiológicos de mastites, nos efectivos ovinos estudados, aos agentes antimicrobianos em preparações de aplicação intramamária, disponíveis no mercado nacional, para verificar a sua adequação ao controlo de mastites ovinas.

3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 – Teste de sensibilidade aos antibióticos - método de difusão

Um total de 404 isolados de bactérias provenientes de leite de ovelhas afectadas com mastite clínica ou subclínica foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), utilizando o método de difusão de Kirby Bauer (NCCLS, 2002), para estudar a susceptibilidade dos microrganismos causadores de mastites em ovinos a agentes antibacterianos.

Os agentes etiológicos de mastite ovina submetidos a este estudo estão discriminados na Tabela 25.

Para cada isolado de bactérias de crescimento rápido, foi inicialmente efectuada uma suspensão em soro fisiológico estéril, com uma turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de McFarland. Esta suspensão foi então inoculada à superfície de placas de meio de Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM337), nas quais, após incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos, foram colocados os discos impregnados de antibiótico (Oxoid) com o auxílio de um aplicador de discos (Oxoid, ST 6090). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C, durante 24 horas. As estirpes de microrganismos fastidiosos (*Streptococcus spp.*, *Actinomyces pyogenes* e *Corynebacterium spp.*) foram preparadas em suspensão com turvação equivalente ao grau 2 da escala de McFarland e inoculadas em meio de Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de ovino desfibrinado (NCCLS, 2002).

Após o período de incubação, as placas foram observadas, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os resultados interpretados de acordo com as tabelas apropriadas (Difco, 1978; Carter e Cole, 1990; NCCLS, 1994; 2002).

Tabela 25: Bactérias submetidas ao teste de susceptibilidade a antibióticos

Microrganismo		N
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		127
<i>Staphylococcus xylosus</i>		62
<i>Staphylococcus hyicus</i>		26
<i>Staphylococcus simulans</i>		25
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		10
Outros SCN	<i>Staphylococcus warneri</i> (n=8) <i>Staphylococcus lentus</i> (n=8) <i>Staphylococcus capitis</i> (n=4) <i>Staphylococcus cohnii</i> (n=2) <i>Staphylococcus caprae</i> (n=2) <i>Staphylococcus hominis</i> (n=2) <i>Staphylococcus sciuri</i> (n=3) <i>Staphylococcus sp.</i> (n=3)	32
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=27) <i>Staphylococcus intermedius</i> (n=1)	28
<i>Streptococcus agalactiae</i>		17
Outros cocos Gram+ Catalase-	<i>Streptococcus equinus (bovis)</i> (n=4) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (n=1) <i>Streptococcus adjacens</i> (n=1) <i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> (n=1) <i>Streptococcus acidominimus</i> (n=2) <i>Streptococcus mitis</i> (n=1) <i>Streptococcus suis</i> (n=1) <i>Streptococcus sanguis</i> (n=1) <i>Streptococcus sp.</i> (n=2) <i>Lactococcus lactis</i> (n=3) <i>Aerococcus viridans</i> (n=5)	22
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=12) <i>Enterococcus faecium</i> (n=3) <i>Enterococcus durans</i> (n=2) <i>Enterococcus sp.</i> (n=1)	18
Bacilos Gram+	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (n=4) <i>Corynebacterium jeikeium</i> (n=6) <i>C. glucoronolyticum</i> (n=6) <i>C. accolens</i> (n=1) <i>C. striatum-amycolatum (gr.F2)</i> (n=2) <i>Corynebacterium sp.</i> (n=5)	24
Bacilos Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=8) <i>Pasteurella multocida</i> (n=1) <i>Escherichia coli</i> (n=2) <i>Serratia marcescens</i> (n=2)	13

Os princípios activos estudados estão agrupados, na Tabela 26, segundo a sua estrutura química e respectivo modo de acção.

Tabela 26: Agentes antibacterianos utilizados neste estudo agrupados segundo a sua estrutura química e respectivo modo de acção

Agentes antibacterianos	Modo de acção
Antibióticos β -lactâmicos 1 – Penicilina (P) Penicilinas semi-sintéticas 2 – Ampicilina (AMP) 3 – Cloxacilina (OB) Cefalosporinas Grupo II 4 – Cefalexina (CL) 5 – Cefuroxima CXM) Grupo III 6 – Cefoperazona (CFP)	Inibidores da parede celular
Antibióticos Polipeptídeos 7 – Bacitracina (B) 8 – Colistina-Sulfato (CT) 9 – Polimixina B (PB)	Inibidores da membrana citoplasmática
Antibióticos Aminoglicosídeos 10 – Estreptomicina (S) 11 – Gentamicina (CN) 12 – Neomicina (N)	Inibidores da síntese de proteínas
Antibióticos Macrólidos e Lincosamidas 13 – Lincomicina (MY) * 14 – Oleandomicina (OL)	
Tetraciclina (Antibióticos) 15 – Oxitetraciclina (OT)	
Outros Antibióticos 16 – Novobiocina (NV) 17 – Rifampicina (RD)	Inibidores da replicação do DNA
Agentes quimioterápicos 18 – Sulfamidas (S3) 19 – Trimetoprim (W)	Bloqueio da transcrição (DNA→RNA)
	Inibidores competitivos

Diferenças observadas entre o efeito de agentes antimicrobianos com modo de acção semelhante, sobre cada grupo de microrganismos analisado, foram estudadas utilizando o teste de Friedman. A análise dos dados foi elaborada recorrendo ao programa SPSS versão 12.0.

Foram definidos 8 grupos de microrganismos:

- 1 – *Staphylococcus epidermidis* (N = 127);
- 2 – outros SCN (N = 155);
- 3 – *Staphylococcus aureus* (N = 28);
- 4 – *Streptococcus agalactiae* (N = 17);
- 5 – outros cocos Gram-positivos catalase negativos (N = 22);
- 6 – *Enterococcus spp.* (N = 18);
- 7 – bacilos Gram-positivos (N = 24);
- 8 – bacilos Gram-negativos (N = 13).

3.2.2 – Determinação da concentração inibitória mínima - método de diluições

O sistema Vitek 2 Compact (bioMérieux), e respectiva carta para *Staphylococcus spp.* (AST-P536, Ref. 22 068), foram utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um conjunto de antibióticos capaz de inibir o crescimento de 108 isolados de *Staph. epidermidis* e 22 de *Staph. aureus*. No presente estudo, foram considerados os resultados obtidos face a penicilina, gentamicina, clindamicina, rifampicina, tetraciclina, oxacilina e a associação sulfamidas/trimetoprim.

O sistema Vitek 2 é um método automatizado que se baseia na metodologia das microdiluições. Em vez de microplacas, são utilizadas cartas de sensibilidade aos antibióticos que são uma versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para determinar a CIM pelo método das microdiluições (Vitek 2, 2005).

Para o controlo de qualidade foi utilizada a estirpe de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, conforme as indicações do Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing (NCCLS, 2002).

3.2.3 – Comparação do método de difusão com o método de diluições

Para cada isolado, foram comparados os resultados das CIMs da penicilina, da gentamicina e da rifampicina com os respectivos resultados do método de difusão. Os resultados das CIMs da oxacilina, clindamicina e tetraciclina, para cada isolado estudado, foram comparados com os resultados obtidos pelo método de difusão para a cloxacilina, lincomicina e oxitetraciclina, respectivamente.

Foram considerados três tipos de discrepâncias (Klement *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2006b): *minor error*, quando o resultado de um dos testes indica uma estirpe com susceptibilidade intermédia e o outro indica susceptibilidade ou resistência; *major error*, quando o resultado do teste de difusão é resistente, mas o resultado do teste de diluições é sensível, portanto, um falso resistente no teste de difusão e *very major error*, quando o resultado do teste de difusão é sensível, mas o resultado do teste de diluições é resistente, um falso sensível no teste de difusão.

3.3 – RESULTADOS

3.3.1 – Teste de sensibilidade aos antibióticos - método de difusão

Todas as espécies de SCN avaliadas revelaram elevada susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e à bacitracina, que também actua por inibição da parede celular. Estes microrganismos, evidenciaram também boa susceptibilidade aos agentes aminoglicosídeos estudados, particularmente à gentamicina e à neomicina, e à rifampicina.

O perfil de susceptibilidade exibido por cada grupo de SCN estudado aos 19 agentes antimicrobianos avaliados neste trabalho está representado nos Gráficos 3 a 8.

Nenhum dos agentes antimicrobianos analisados inibiu *in vitro* a totalidade dos isolados de *Staphylococcus epidermidis* em estudo (Gráfico 3).

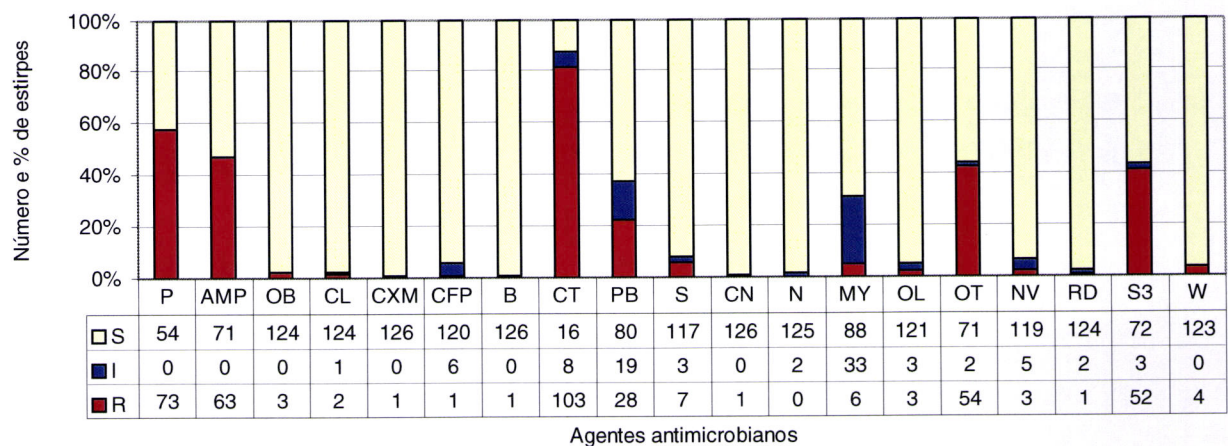


Gráfico 3: Susceptibilidade de *Staphylococcus epidermidis* (n = 127)

Três dos agentes antimicrobianos revelaram capacidade para inibir *in vitro* a totalidade dos isolados de *Staphylococcus xylosus* estudados, designadamente polimixina B, gentamicina e neomicina. (Gráfico 4).

De todas as espécies de SCN incluídas neste trabalho, *Staph. xylosus* apresentou menor susceptibilidade a novobiocina, 52% dos isolados revelaram ser resistentes e 24% exibiram resistência intermédia.

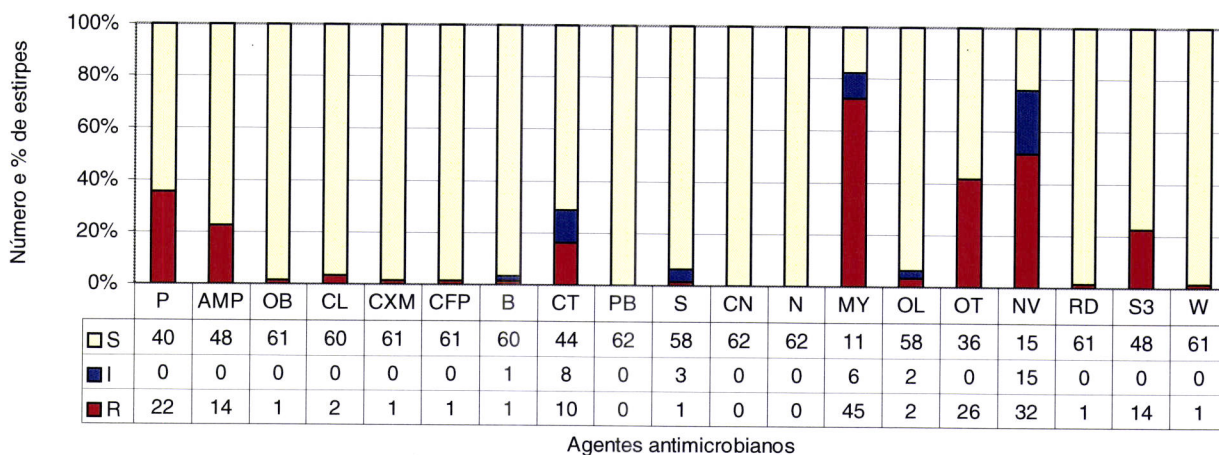


Gráfico 4: Susceptibilidade de *Staphylococcus xylosus* (n = 62)

Relativamente a *Staphylococcus hyicus*, todos os isolados em estudo exibiram susceptibilidade a cloxacilina, a cefalexina, a cefuroxima, a bacitracina, a estreptomicina, a gentamicina e a neomicina (Gráfico 5).

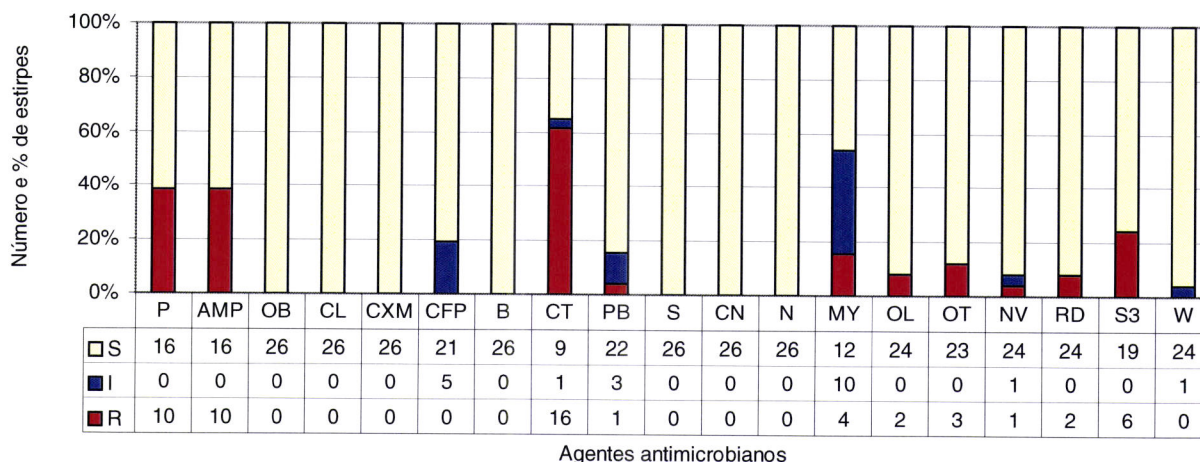


Gráfico 5: Susceptibilidade de *Staphylococcus hyicus* (n = 26)

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos referentes a *Staphylococcus simulans* indicaram susceptibilidade de todos os isolados em análise a cloxacilina, a cefuroxima, a bacitracina, a polimixina B, a estreptomicina, a gentamicina, a neomicina e a rifampicina (Gráfico 6).

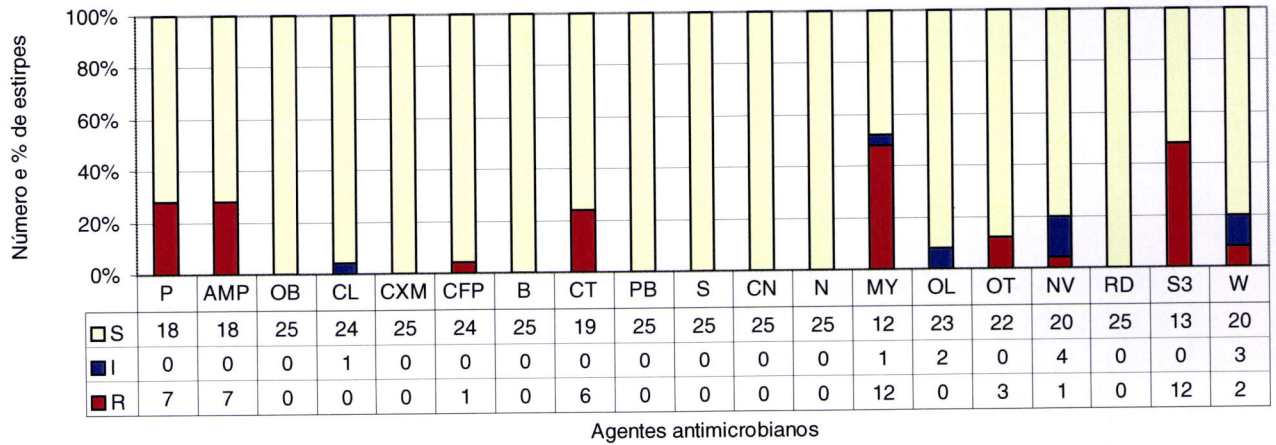


Gráfico 6: Susceptibilidade de *Staphylococcus simulans* (n = 25)

Apenas 10 isolados de *Staphylococcus chromogenes* foram objecto do presente estudo, porém, foram 12 os agentes antimicrobianos que revelaram total eficiência no seu combate *in vitro*. Estes foram, além das 3 cefalosporinas testadas, cefalexina, cefuroxima e cefoperazona, cloxacilina, bacitracina, polimixina B, estreptomicina, gentamicina, neomicina, novobiocina, rifampicina e trimetoprim (Gráfico 7).

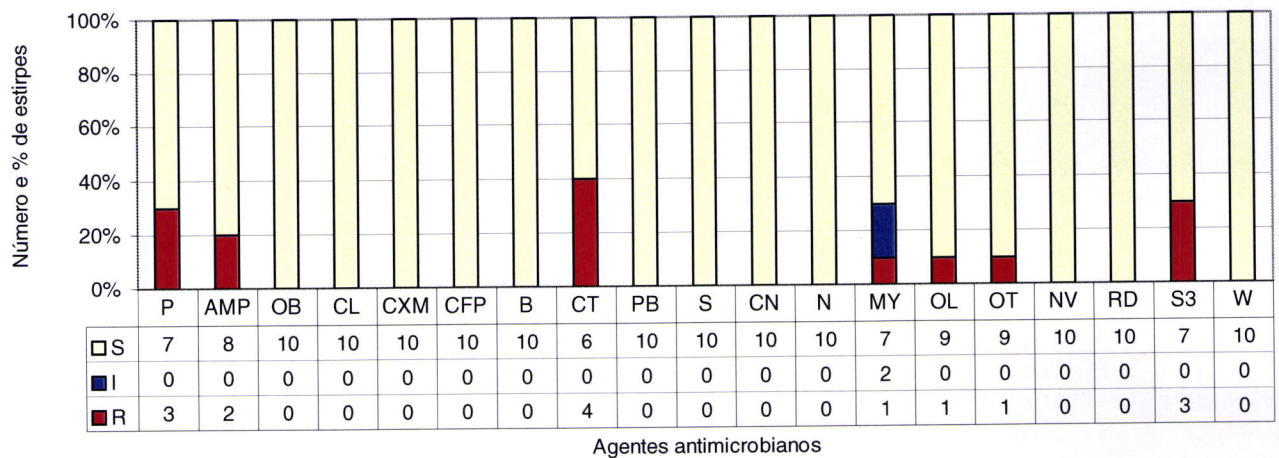


Gráfico 7: Susceptibilidade de *Staphylococcus chromogenes* (n = 10)

O grupo designado por “outros SCN” integra sete espécies de *Staphylococci*, descritas na Tabela 25 e três isolados não identificados de *Staphylococcus spp.*. A totalidade dos isolados foi susceptível a cloxacilina, a cefalexina, a cefuroxima, a gentamicina, a neomicina e a rifampicina (Gráfico 8).

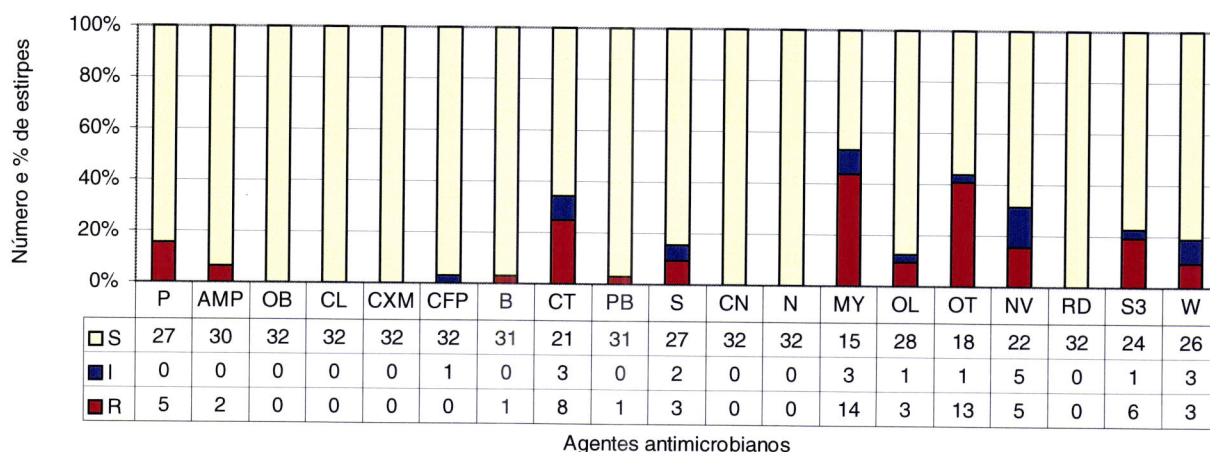


Gráfico 8: Susceptibilidade de outros SCN (n = 32)

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *Staphylococcus aureus*, apresentado no Gráfico 9, evidencia sensibilidade de todos os isolados em estudo a cefoperazona e a gentamicina. Porém, exceptuando a colistina, a polimixina B e a lincomicina, os restantes agentes antimicrobianos avaliados neste estudo revelaram capacidade para inibir mais de 82% dos isolados.

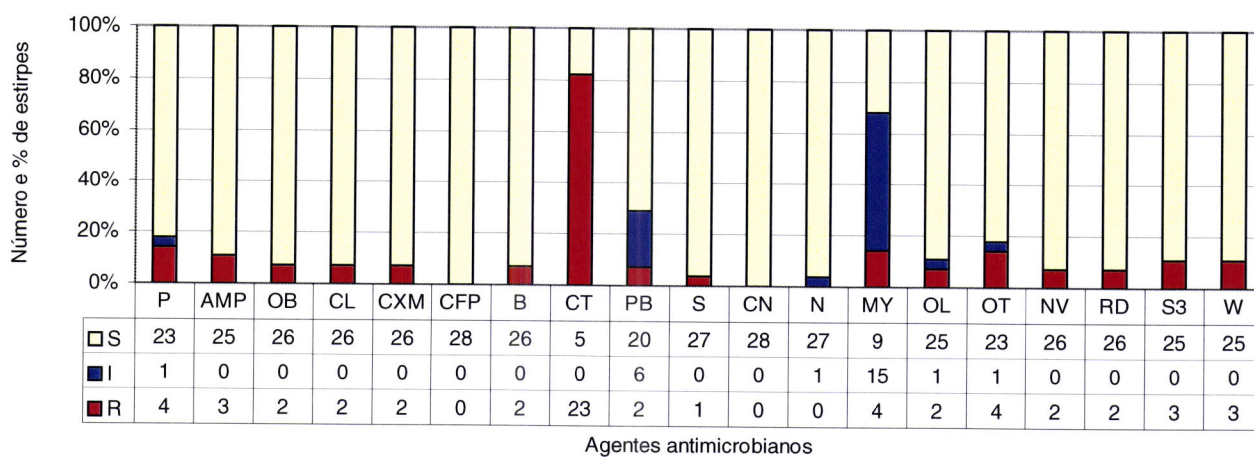


Gráfico 9: Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* (n = 28)

Dos 17 antibióticos testados face a *Streptococcus agalactiae*, apenas cefuroxima e bacitracina foram capazes de inibir a totalidade dos isolados em estudo. Contudo, não se verificou a ocorrência de estirpes resistentes a cefoperazona nem a rifampicina e a cloxacilina, a cefalexina e a oleandomicina foram eficazes face a mais de 88% dos isolados em análise (Gráfico 10).

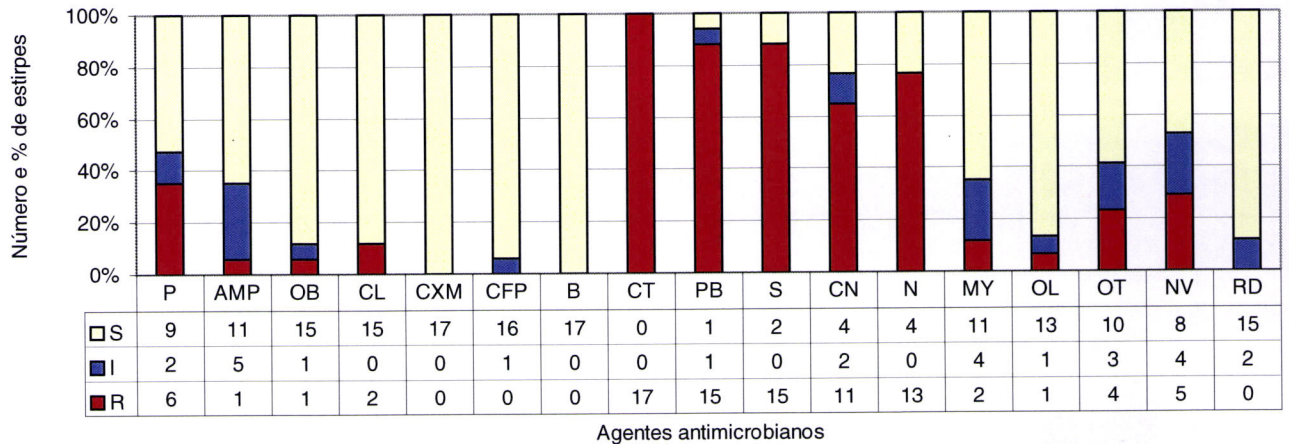


Gráfico 10: Susceptibilidade de *Streptococcus agalactiae* (n = 17)

Quanto aos restantes grupos de microrganismos integrados no presente estudo, nenhum dos agentes antimicrobianos avaliados revelou, *in vitro*, uma capacidade para inibir a totalidade dos isolados.

O grupo de microrganismos designado por “outros cocos Gram positivos, catalase negativos” integra várias espécies de *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* e *Aerococcus viridans* (Tabela 25). Face a estas bactérias, o antibiótico que apresentou melhor actividade antibacteriana foi a bacitracina, ao qual 86% dos isolados em estudo foram sensíveis (Gráfico 11).

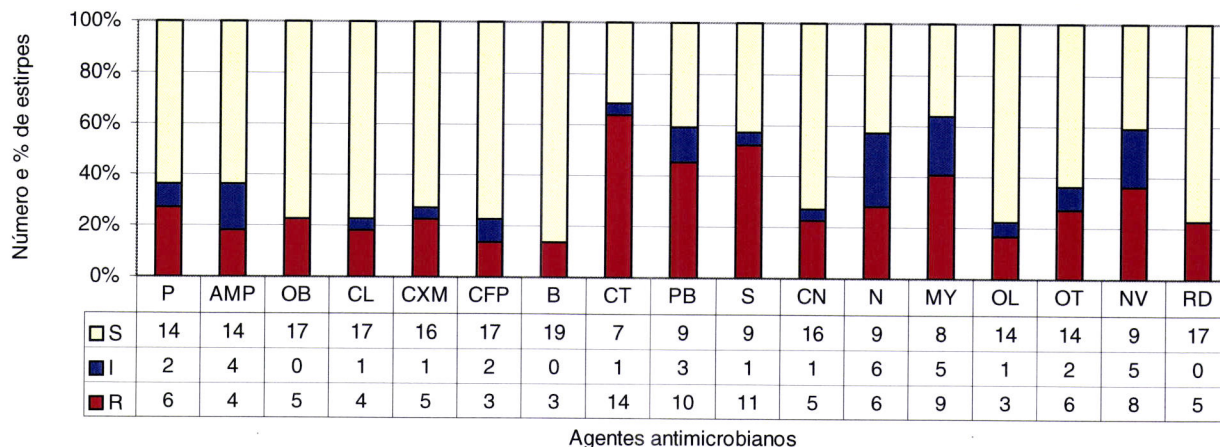


Gráfico 11: Susceptibilidade de outros cocos Gram + catalase – (n = 22)

De entre os agentes etiológicos de mastite estudados, os microrganismos pertencentes ao género *Enterococcus* revelaram ser, entre as bactérias Gram-positivas, as menos susceptíveis, *in vitro*, aos antibióticos em estudo. Porém, a penicilina e a ampicilina revelaram eficácia face a 94% dos isolados testados, não tendo havido estirpes resistentes a estes antibióticos, nem à oleandomicina. A gentamicina revelou capacidade para inibir 83% dos isolados que integraram este ensaio (Gráfico 12).

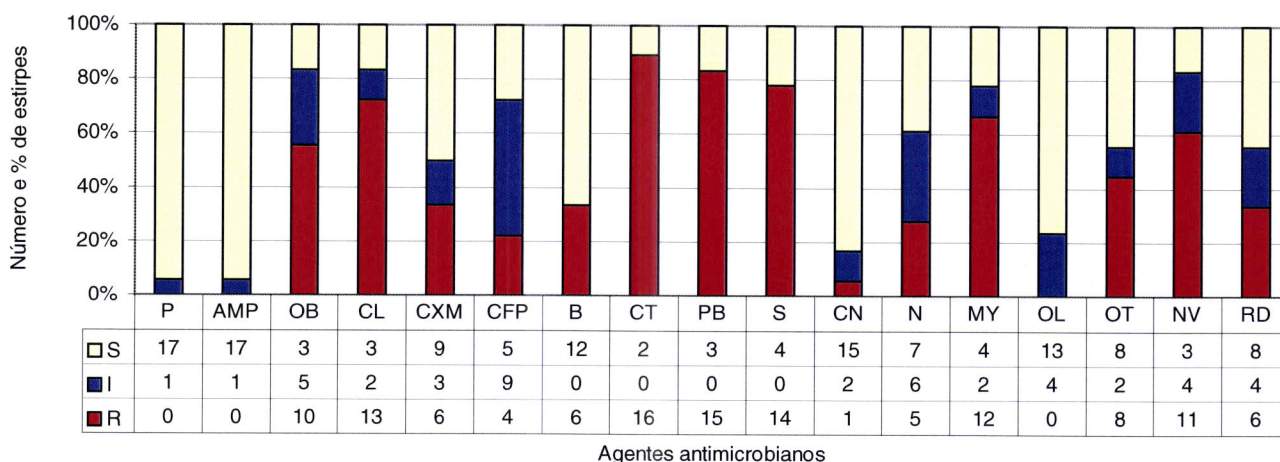


Gráfico 12: Susceptibilidade de *Enterococcus spp.* (n = 18)

Relativamente ao conjunto dos bacilos Gram positivos, 88% dos isolados exibiram sensibilidade a bacitracina e 83% a cefuroxima, a gentamicina, a neomicina e a oleandomicina. O número de isolados resistentes a cloxacilina foi menor do que para aqueles antibióticos, embora apenas 79% dos isolados se tenham revelado sensíveis (Gráfico 13).

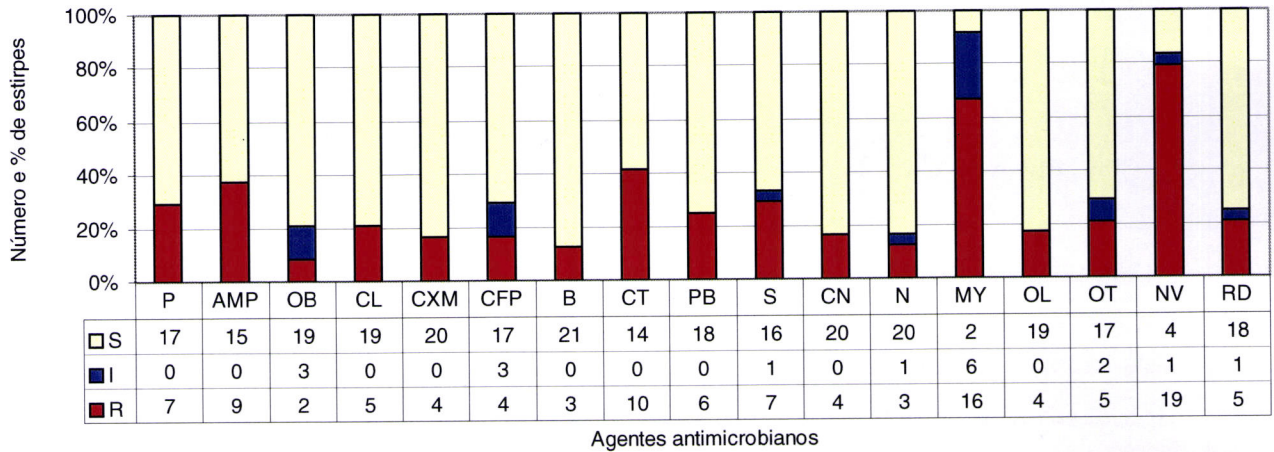


Gráfico 13: Susceptibilidade de bacilos Gram + (n = 24)

As sulfamidas evidenciaram uma acção antibacteriana contra bacilos Gram negativos capaz de actuar sobre 92% dos isolados em estudo. A gentamicina apresentou efeito inibidor face a 85% dos isolados, mas apenas um isolado revelou resistência a este antibiótico, tal como aconteceu para as sulfamidas (Gráfico 14).

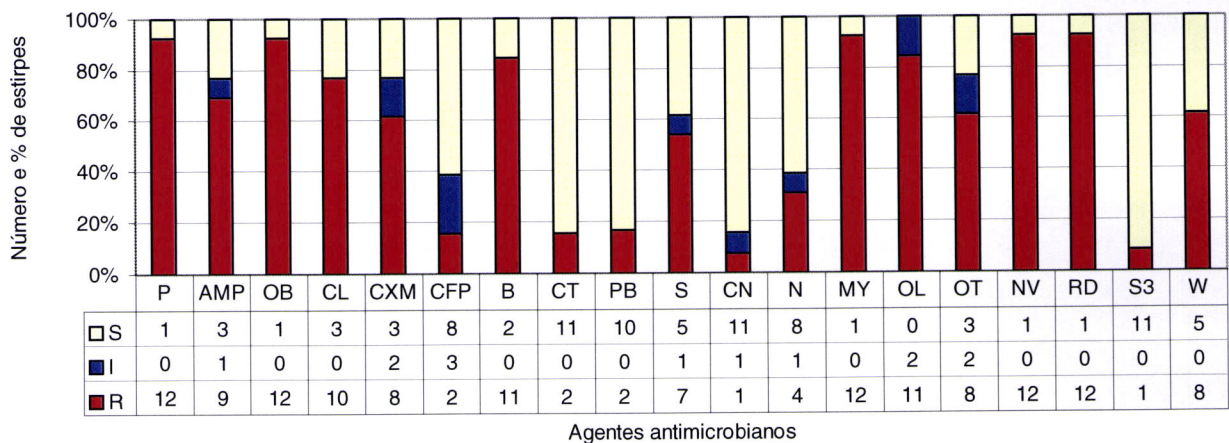


Gráfico 14: Susceptibilidade de bacilos Gram - (n = 13)

O Teste de Friedman permitiu verificar que as diferenças encontradas entre a actividade *in vitro* da penicilina e a da ampicilina não foram significativas ($P>0,05$) relativamente a todos os oito grupos de microrganismos analisados.

A actividade das três cefalosporinas estudadas e da cloxacilina também não apresentou diferenças significativas ($P>0,05$) quando testadas *in vitro* face a sete dos grupos de bactérias considerados. Porém, relativamente ao grupo dos bacilos Gram-negativos, quando comparadas a cloxacilina com a cefoperazona, verificou-se que as respectivas actividades antimicrobianas apresentam diferenças significativas ($P<0,01$). Não houve diferenças significativas entre as três cefalosporinas ($P>0,05$) e entre a cloxacilina, a cefalexina e a cefuroxima ($P>0,05$), para o mesmo grupo de microrganismos.

Os dois antibióticos polipeptídeos inibidores da membrana citoplásmica que integraram este estudo, colistina e polimixina B, apresentaram diferenças muito significativas ($P<0,001$) quanto à sua actividade face a *Staphylococcus epidermidis* e outros SCN, tendo também apresentado diferenças significativas ($P<0,05$) relativamente a *Staphylococcus aureus*. Porém, quando comparadas as suas actividades antimicrobianas face aos outros cinco grupos definidos, as diferenças não foram significativas ($P>0,05$) e, para a totalidade de isolados de bacilos Gram-negativos, não existiram diferenças.

As actividades antimicrobianas apresentadas pelos três antibióticos aminoglicosídeos, estreptomicina, gentamicina e neomicina, não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) relativamente a seis dos oito grupos de microrganismos considerados. Contudo, face a *Enterococcus* e a bacilos Gram-negativos, a actividade da estreptomicina apresenta diferenças significativas ($P<0,05$) relativamente à actividade da gentamicina.

Quando comparadas as actividades antibacterianas dos dois antibióticos com modo de acção semelhante, lincomicina e oleandomicina, estas não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) contra *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, outros cocos Gram-positivos catalase negativos e bacilos Gram-negativos. No entanto, face a todos os outros SCN e a bacilos

Gram-positivos, a diferença foi significativa ($P < 0,001$) e, relativamente a *Enterococcus*, a diferença foi extremamente significativa ($P < 0,0005$).

Os dois agentes quimioterápicos inibidores competitivos avaliados neste trabalho sulfamidas e trimetoprim, revelaram diferenças significativas quando comparadas as suas capacidades antimicrobianas face a *Staph. epidermidis* ($P < 0,001$) e a bacilos Gram-negativos ($P < 0,05$). Mas quando comparadas estas actividades relativamente a outros SCN e a *Staphylococcus aureus*, estas diferenças não foram significativas ($P > 0,05$).

3.3.2 – Determinação da concentração inibitória mínima – método de diluições

Os valores da CIM para todos os princípios activos testados face à estirpe de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 encontraram-se dentro dos valores esperados.

A concentração mínima de penicilina necessária para inibir 50% dos isolados de *Staph. epidermidis* (CIM₅₀) foi 0,25 µg/mL e a CIM para 90% dos isolados (CIM₉₀) foi maior ou igual a 0,5 µg/mL. Na Tabela 27 são apresentados as CIMs de penicilina, de oxacilina, de gentamicina, de clindamicina, de tetraciclina, de rifampicina, e da associação de sulfamidas com trimetoprim para os isolados de *Staph. epidermidis* e para os de *Staph. aureus* incluídos neste ensaio.

Os valores encontrados para a CIM₅₀ e para a CIM₉₀ de oxacilina situaram-se dentro dos limites da sensibilidade tanto para os isolados de *Staph. epidermidis*, como para os de *Staph. aureus*. Porém, foram detectados três isolados de *Staph. epidermidis* e um de *Staph. aureus* resistentes a este antibiótico.

Todos os isolados incluídos neste ensaio revelaram, através deste método, ser sensíveis à gentamicina, à rifampicina e à associação sulfamidas/trimetoprim.

Tabela 27: Valores de CIM para *Staph. epidermidis* e *Staph. aureus*

Concentração inibitória mínima de penicilina, oxacilina, gentamicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, e sulfamidas + trimetoprim

Agentes antimicrobianos	Limites de CIM ($\mu\text{g/mL}$)			<i>Staphylococcus epidermidis</i> (N=108)			<i>Staphylococcus aureus</i> (N=22)		
	S	I	R	CIM ₅₀	CIM ₉₀	intervalo de valores	CIM ₅₀	CIM ₉₀	intervalo de valores
Penicilina G	$\leq 0,12$		$\geq 0,25$	0,25	$\geq 0,5$	$\leq 0,03$ a $\geq 0,5$	0,06	0,12	$\leq 0,03$ a $\geq 0,12$
Oxacilina *	≤ 2 (S. aur.) $\leq 0,25$ (SCN)		≥ 4 (S. aur.) $\geq 0,5$ (SCN)	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$ a ≥ 4	$\leq 0,25$	0,5	$\leq 0,25$ a ≥ 4
Gentamicina *	≤ 4		≥ 8	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ (100%)	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ (100%)
Clindamicina	$\leq 0,5$	1/2	≥ 4	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$ (100%)	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$ a 1
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	2	≥ 16	≤ 1 a ≥ 16	≤ 1	≤ 1	≤ 1 a ≥ 16
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ (100%)	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ (100%)
Sulfamidas + Trimetoprim	$\leq 2/38$		$\geq 4/76$	$\leq 0,5/9,5$	$\leq 0,5/9,5$	$\leq 0,5/9,5$ (100%)	$\leq 0,5/9,5$	$\leq 0,5/9,5$	$\leq 0,5/9,5$ (100%)

S – sensível; I – intermédio; R - resistente

* CLSI, 2006

3.3.3 – Comparação do método de difusão com o método de diluições

Os resultados obtidos para cada isolado, utilizando o método de difusão, foram comparados com os respectivos resultados obtidos através do método de diluições e foi determinado o nível de concordância entre os dois métodos, para cada antibiótico relativamente às duas espécies, *Staph. epidermidis* e *Staph. aureus*.

Para o estudo da penicilina, foram consideradas 98 isolados de *Staph. epidermidis* e a correlação entre a CIM e o diâmetro do halo de inibição está representada no gráfico de dispersão (Gráfico 15). Destes isolados, 5 (5,1%) apresentaram discrepância do tipo *major error* e 10 (10,2%) de *very major error*. A concordância entre os dois métodos foi de 84,7% (Tabela 28).

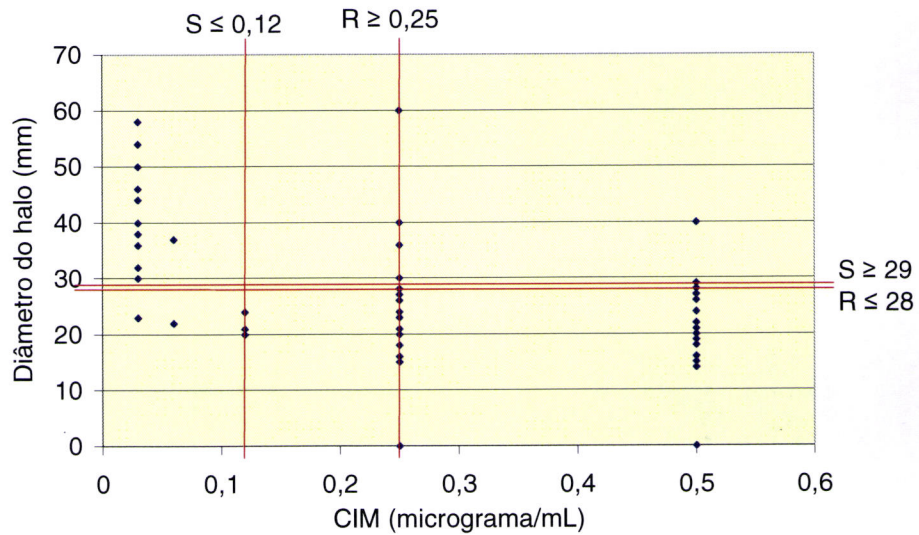


Gráfico 15: Correlação entre a CIM e TSA de penicilina para *Staph. epidermidis*

Os resultados das CIMs de oxacilina para os isolados que integraram este ensaio foram comparados com os resultados obtidos pelo teste de difusão relativos à cloxacilina. No Gráfico 16 apresenta-se a correlação encontrada para 101 isolados de *Staph. epidermidis*. Os níveis de concordância entre os métodos para os antibióticos estudados, relativos a esta espécie, estão discriminados na Tabela 28.

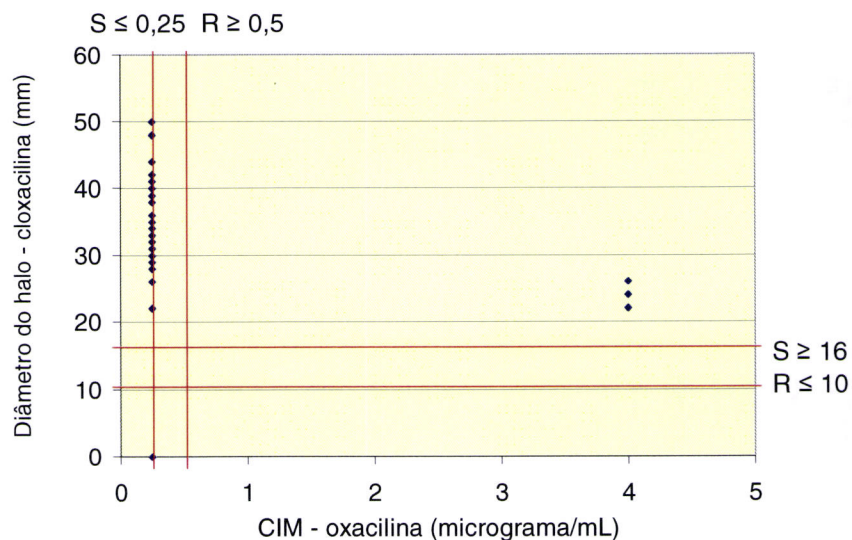


Gráfico 16: Correlação entre a CIM de oxacilina e TSA de cloxacilina para *Staph. epidermidis*

As análises de susceptibilidade de 103 isolados de *Staph. epidermidis* à gentamicina apresentaram um nível de concordância entre os dois métodos de 99%. Apenas um isolado revelou discrepância do tipo *major error* (Gráfico 17 e Tabela 28)

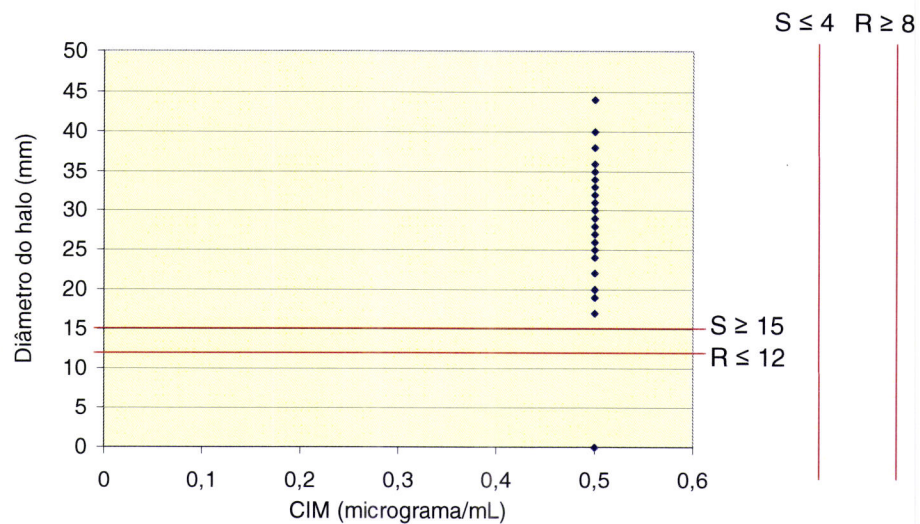


Gráfico 17: Correlação entre a CIM e TSA de gentamicina para *Staph. epidermidis*

Foram comparados os resultados das CIMs de clindamicina com os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos para a lincomicina em 103 isolados de *Staph. epidermidis* (Gráfico 18). A concordância entre os dois métodos é de 65% (Tabela 28).

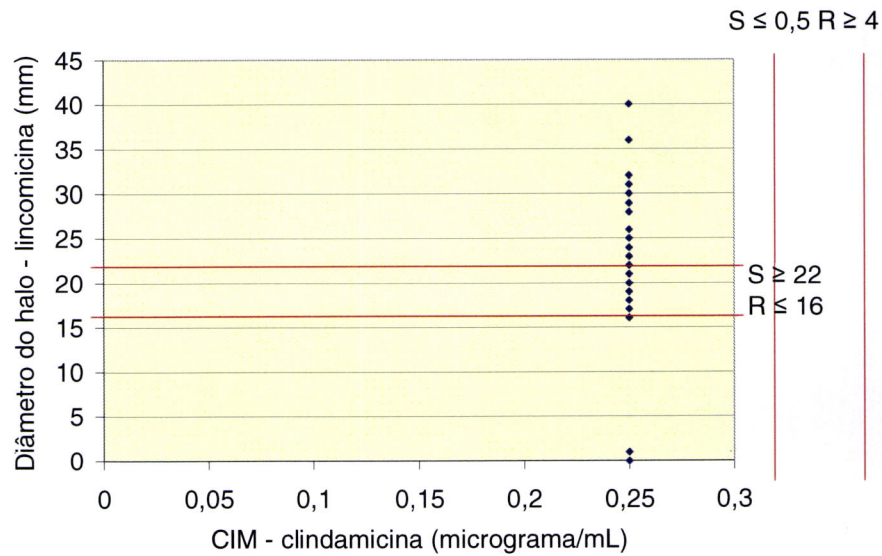


Gráfico 18: Correlação entre a CIM de clindamicina e TSA de lincomicina para *Staph. epidermidis*

A comparação dos resultados das CIMs de tetraciclina para 104 isolados de *Staph. epidermidis*, com os resultados da susceptibilidade dos mesmos isolados à oxitetraciclina pelo método de difusão, revelou 93,3% de concordância entre os dois métodos (Tabela 28). Esta correlação está representada no Gráfico 19.

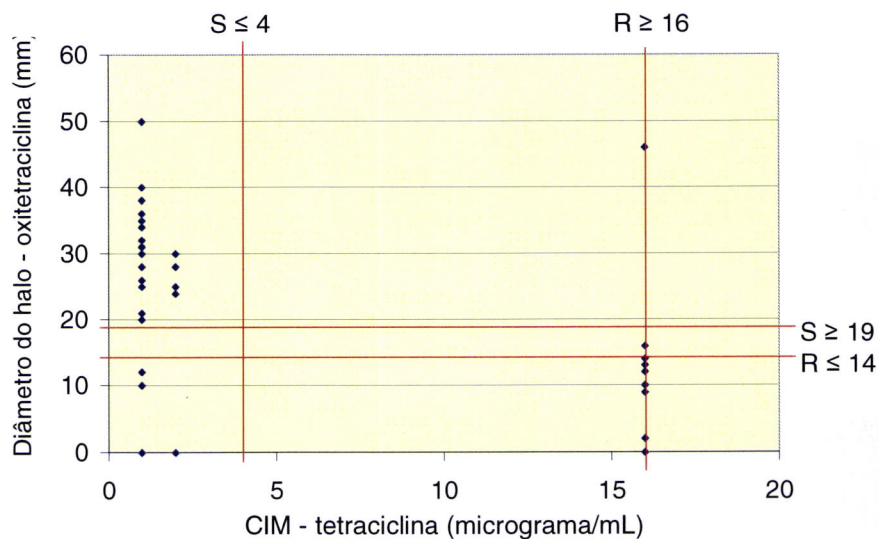


Gráfico 19: Correlação entre a CIM de tetraciclina e TSA de oxitetraciclina para *Staph. epidermidis*

Relativamente à rifampicina, a concordância entre os dois métodos de estudo de sensibilidade aos antibióticos, em 86 isolados de *Staph. epidermidis*, foi de 97,7% (Tabela 28). Na representação gráfica da correlação entre os resultados obtidos, é possível verificar as discrepâncias observadas (Gráfico 20).

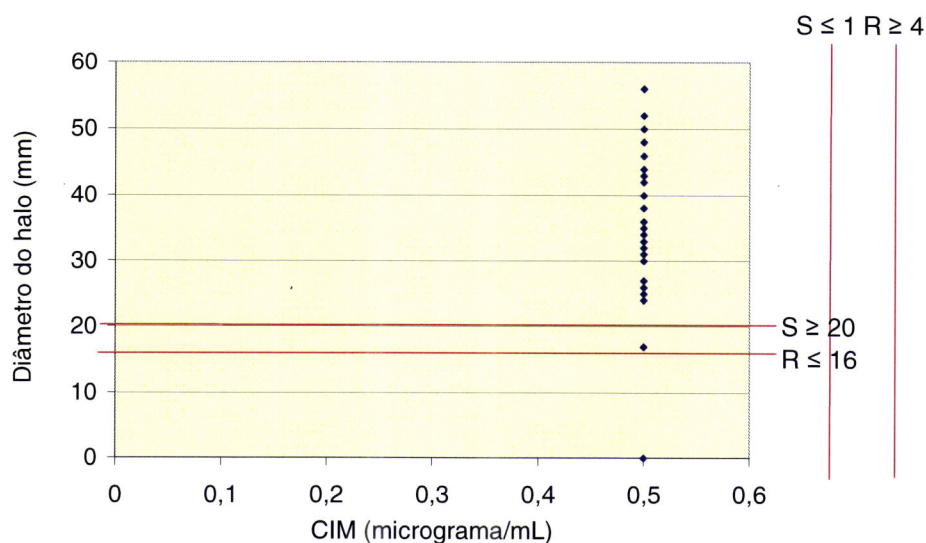


Gráfico 20: Correlação entre a CIM e TSA de rifampicina para *Staph. epidermidis*

Tabela 28: Comparação entre os dois métodos de antibiograma para *Staph. epidermidis*
(Discrepâncias e nível de concordância)

	Antibiótico					
	P (N = 98)	OB/OX (N = 101)	CN (N = 103)	MY/CM (N = 103)	OT/TE (N = 104)	RD (N = 86)
Minor error (N)	-	-	-	32	1	1
Major error (N)	5	2	1	4	5	1
Very major error (N)	10	3	-	-	1	-
Concordância (%)	84,7	95	99	65	93,3	97,7

Quanto aos isolados de *Staph. aureus*, a concordância entre os dois métodos foi de 100% para a gentamicina, para a rifampicina e para as tetraciclina. Para a

penicilina o nível de concordância foi de 81,8%, visto que 4 isolados (18,2%) apresentaram uma discrepância do tipo *major error*. A comparação entre os resultados das CIMs de oxacilina com os resultados da inibição em gel provocada por cloxacilina revelou uma concordância de 95,5% (Tabela 29).

Tabela 29: Comparação entre os dois métodos de antibiograma para *Staph. aureus*
(Discrepâncias e nível de concordância)

	Antibiótico					
	P	OB/OX	CN	MY/CM	OT/TE	RD
<i>Minor error</i> (N)	-	-	-	15	-	-
<i>Major error</i> (N)	4	-	-	1	-	-
<i>Very major error</i> (N)	-	1	-	-	-	-
Concordância (%)	81,8	95,5	100	27,3	100	100

O teste de sensibilidade às sulfamidas foi feito separadamente do teste para o trimetoprim, quando utilizado método de difusão. Para a pesquisa das CIMs pelo método de diluições, estes dois agentes quimioterápicos foram testados em associação. A totalidade das 88 isolados de *Staph. epidermidis* foram sensíveis à associação de princípios activos. Quando testados isoladamente, apenas dois isolados revelaram ser resistentes a ambos, tendo os restantes exibido sensibilidade a um ou os dois agentes quimioterápicos (Gráfico 21).

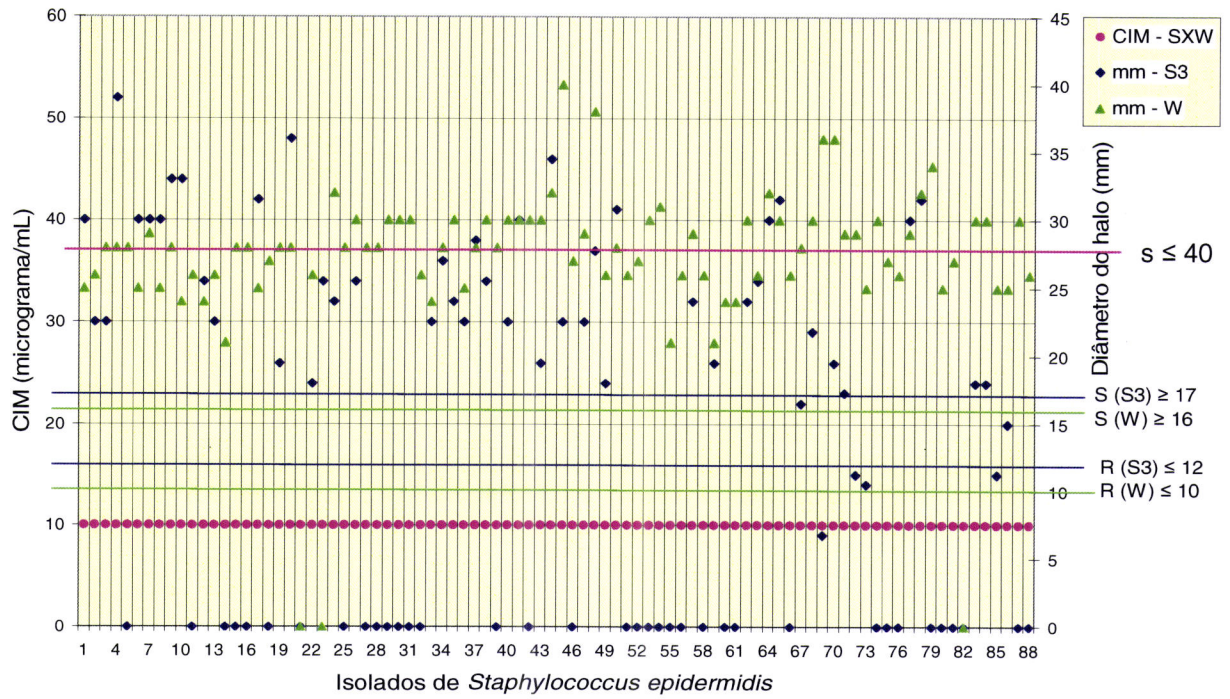


Gráfico 21: Comparação entre a CIM de sulfamidas+trimetoprim e TSA de sulfamidas e de trimetoprim para *Staph. epidermidis*

3.4 – DISCUSSÃO

Os agentes antimicrobianos são largamente utilizados para o controlo de mastites. Para minimizar a pressão de selecção sobre estirpes resistentes a estes medicamentos e proteger a saúde pública e a saúde animal, é imperioso que se cumpram as normas para uso prudente de antibióticos. Entre os princípios básicos para uma escolha e utilização prudente dos antibióticos, preconizados por muitos organismos, entre os quais a Federação de Veterinários da Europa (FVE, 2005), destaca-se a importância de conhecer a sensibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos. De acordo com este documento, os antibióticos só deverão ser utilizados quando se sabe ou se suspeita que o agente infeccioso a combater é susceptível à terapia. Assim, sempre que possível, a susceptibilidade do agente etiológico deve ser verificada previamente ao início da terapêutica. Visto que, frequentemente, isso não é possível, é importante monitorizar a susceptibilidade dos agentes patogénicos ao longo do tempo, com a finalidade de fornecer informação para a escolha do agente antimicrobiano em situações de necessidade de rápida intervenção que não possibilitem a elaboração prévia de antibiograma. Estes estudos permitem indicar o antibiótico de primeira escolha, nessas situações e, também, qual o antibiótico que deverá ser escolhido em situações em que o agente antimicrobiano de primeira escolha não resolve o problema, “antibiótico de segunda escolha” (Bexiga *et al.*, 2003).

No presente trabalho, avaliámos a susceptibilidade de 404 agentes etiológicos de mastite ovina a um conjunto de princípios activos que integram a constituição de medicamentos de aplicação intramamária comercializados em Portugal. Foram testados os princípios activos presentes nos medicamentos e não apenas representantes das várias classes de antibióticos. Segundo Constable e Morin (2003), a utilização de antibióticos específicos que são representativos da sua classe nos testes de sensibilidade, em vez dos que efectivamente constam das preparações medicamentosas, pode conduzir a resultados erróneos.

O método de difusão em agar ou método de Kirby-Bauer foi utilizado neste estudo. Este método foi escolhido por permitir um estudo mais abrangente,

relativamente ao método das diluições, tanto em termos de isolados em análise como em termos de agentes antimicrobianos avaliados. O método de difusão é considerado pelo Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing do NCCLS (NCCLS, 2002) como fornecendo resultados de confiança, correlacionados com as concentrações inibitórias mínimas e com o comportamento das estirpes entre espécies clinicamente susceptíveis e resistentes.

Para complementar este estudo, uma colecção de 108 isolados de *Staphylococcus epidermidis* e 22 de *Staphylococcus aureus* foi analisada pelo método de diluições e os resultados obtidos para alguns antibióticos foram comparados com os resultados do método de difusão.

Sempre que possível, a interpretação dos resultados dos antibiogramas foi realizada com recurso às tabelas recomendadas para bactérias isoladas a partir de amostras clínicas de animais (NCCLS, 2002). Porém, alguns dos antibióticos avaliados neste trabalho não constam da referida tabela, tendo, nesse caso sido utilizadas tabelas indicadas para estirpes de origem humana (Difco, 1978; NCCLS, 1994). Este procedimento segue o princípio utilizado para a elaboração do documento NCCLS (2002), o qual, relativamente a alguns antibióticos, também utiliza os padrões de sensibilidade de bactérias isoladas de humanos para interpretação de resultados de bactérias de origem veterinária.

Relativamente à acção antimicrobiana dos princípios activos estudados, vários antibióticos revelaram uma acção antibacteriana *in vitro* bastante eficaz para *Staphylococci*, tendo-se verificado que mais de 90% dos isolados de todas as espécies avaliadas (n=310) foram sensíveis a cloxacilina, a cefalexina, a cefuroxima, a bacitracina, a gentamicina, a neomicina e a rifampicina.

Estes resultados poderão contribuir para uma selecção mais fundamentada do agente antimicrobiano a utilizar para o controlo profiláctico de mastites em ovelhas, tal como os antibióticos de primeira e segunda escolha para a terapia de mastite. Bexiga e colaboradores (2003) referem a necessidade de conhecer o antibiótico que deverá ser escolhido em situações em que o agente antimicrobiano de primeira escolha não resolve o problema.

Para profilaxia e para utilização terapêutica de primeira escolha será importante a utilização de um agente antimicrobiano ou uma combinação de dois princípios activos que inibam a maioria, não sendo possível a totalidade, de agentes patogénicos identificados como causadores de mastite em ovinos. Porém, a utilização de determinadas moléculas mais recentemente desenvolvidas como agentes antimicrobianos não deve ser vulgarizada nem abusiva, devendo apenas servir como recurso para situações complicadas, evitando-se assim a pressão de selecção sobre estirpes resistentes a estes princípios activos. Assim, as cefalosporinas e a rifampicina não deverão ser utilizadas como antibiótico de primeira escolha, podendo então ser reservadas como antibióticos de segunda escolha.

Alguns autores, numa perspectiva concordante com o uso prudente de antibióticos, recomendam a penicilina como primeira escolha para mastites provocadas por *Streptococci* e *Staphylococci* susceptíveis à penicilina (Pyörälä, 2002). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho revelaram uma percentagem elevada de isolados resistentes à penicilina. Estes resultados sugerem a bacitracina ou a cloxacilina como tratamento antimicrobiano de primeira escolha para a terapia de mastite ovina e para utilização profiláctica.

A bacitracina é muito tóxica. Apesar de não ser absorvida pela mucosa da glândula mamária intacta, poderá atingir os tecidos internos, quando o epitélio está danificado.

A cloxacilina é uma penicilina semi-sintética que, apesar de ser largamente utilizada para o tratamento e profilaxia de mastites em bovinos, revelou uma acção antibacteriana bastante eficaz face às espécies de estafilococos isoladas a partir do leite mastítico de ovelhas. Este agente antibacteriano inibiu 93% dos isolados de *Staphylococcus aureus* em estudo e 99% dos de SCN. A sua eficácia relativamente aos outros grupos de microrganismos estudados foi de 88%, 77% e 79% face, respectivamente, a *Streptococcus agalactiae*, a “outros cocos Gram-positivos catalase-negativos” e a “bacilos Gram-positivos”, não tendo exibido resultados satisfatórios face a *Enterococcus* e “bacilos Gram-negativos”.

O antibiótico que se mostrou mais adequado para o controlo dos dois grupos de bactérias, *Enterococci* e “bacilos Gram-negativos”, foi a gentamicina, cuja acção antibacteriana foi eficaz para 83% dos isolados de *Enterococci* e 85% dos de bacilos Gram-negativos. Este antibiótico revelou, anteriormente, a sua eficácia face a bacilos Gram-negativos isolados a partir do leite de ovelhas com mastite (Winter e Baumgartner, 1998) e a várias espécies de *Corynebacteria* também de origem mamária de ovelhas (Fernández *et al.*, 2001).

A gentamicina é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos. Estes agentes antibacterianos são principalmente utilizados para bactérias Gram-negativas, contra as quais têm um efeito bactericida muito rápido. O seu efeito contra organismos Gram-positivos é bacteriostático (Stratton, 1996). Porém, a gentamicina tem um efeito negativo sobre a capacidade fagocitária dos polimorfonucleares neutrófilos mamários *in vitro* (Nickerson *et al.*, 1985; Pappe *et al.*, 1991). Além disso, a gentamicina, tal como outros aminoglicosídeos, tem um tempo de acumulação de resíduos prolongado no leite e na carne (Oliveira *et al.*, 2000; NCCLS, 2002) e só deverá ser utilizada para o controlo de mastites se depois forem rigorosamente cumpridos os intervalos de segurança indicados.

A utilização da cloxacilina em associação com um antibiótico aminoglicosídeo poderá beneficiar a eficiência antibacteriana e reduzir a pressão de selecção sobre estirpes resistentes. A associação de antibióticos pertencentes a estes dois grupos resulta numa maior eficiência uma vez que o antibiótico β -lactâmico, ao actuar sobre a parede celular, beneficia a absorção do aminoglicosídeo (Eliopoulos e Moellering, 1996). Os mesmos autores referem associações de fármacos β -lactâmicos com aminoglicosídeos que revelaram um efeito sinérgico *in vitro* face a diversos géneros de bactérias, entre as quais se destacam bons resultados obtidos para *Enterococci*.

Estes resultados *in vitro* sugerem que a associação cloxacilina e gentamicina induzirá uma acção antimicrobiana capaz de cobrir uma grande variedade de agentes etiológicos de mastite ovina. Porém, como a gentamicina interfere negativamente sobre as defesas celulares mamárias, poderá ser considerada a associação da cloxacilina com a neomicina. Apesar de a farmacodinâmica da neomicina sobre *Enterococcus spp.* e sobre bacilos Gram-negativos não ser tão

eficaz como a da gentamicina, a neomicina não prejudica a fagocitose (Pappe *et al.*, 1991).

A cefuroxima, uma cefalosporina do grupo II (Livermore e Williams, 1996), pode ser escolhida como antibiótico de segunda escolha. Os antibióticos pertencentes a este grupo são activos contra enterobactérias, mas menos eficientes para bactérias Gram-positivas do que as cefalosporinas do grupo I. No entanto, os isolados de estafilococos e de *Streptococcus agalactiae* avaliados no presente trabalho manifestaram particular susceptibilidade a este antibiótico. Outros autores referem percentagens superiores a 95% de isolados de *Staphylococcus aureus* sensíveis (Bouchot *et al.*, 1985; Wiedemann e Grimm, 1996). A eficácia da cefuroxima face aos grupos de “outros cocos Gram-positivos catalase-negativos” e “bacilos Gram-positivos” foi, respectivamente, de 73% e 83%, no entanto, apenas 50% dos isolados de enterococos e 23% de “bacilos Gram-negativos” manifestaram susceptibilidade a este antibiótico. No que respeita à possível pressão de selecção que estes antibióticos podem exercer sobre estirpes produtoras de β -lactamases, um estudo recente indica que após 15 anos de utilização de cefalosporinas em medicina veterinária, não há evidências de redução de susceptibilidade bacteriana em agentes etiológicos de mastites bovinas (Wallmann, 2006).

As preparações medicamentosas de aplicação intramamária que existem no mercado nacional são concebidas para bovinos. Segundo Buswell (1989), a utilização de um destes produtos, em ovelhas lactantes, apesar de ser bem tolerado pela glândula mamária, obriga a um intervalo de segurança aproximadamente três vezes superior ao preconizado para as vacas. Este aspecto não deve ser negligenciado, no caso da sua utilização terapêutica, quando o leite está a ser utilizado para o fabrico de queijos, para não prejudicar o processo queijeiro nem a saúde do consumidor.

Vários autores citam resultados bastante positivos no controlo de mastites em ovinos, com o tratamento de secagem (Hueston *et al.*, 1989; Ahmad *et al.*, 1992b e Tietze *et al.*, 1993). Ahmad e colaboradores (1992b) referem que o efeito se faz sentir principalmente nos casos de mastites causadas por *Staphylococci* coagulase negativos. Esta prática parece não comprometer, no que respeita à

presença de resíduos antibióticos, a qualidade do leite produzido na lactação seguinte (Lohuis *et al.*, 1995).

Considerando as repercussões negativas que a utilização de leite mastítico de ovino pode ter em Saúde Pública e nos processos tecnológicos, além dos prejuízos económicos que daí advêm, o tratamento de secagem poderá constituir uma prática bastante benéfica no manejo de ovinos leiteiros, desde que sejam utilizados medicamentos com princípios activos eficientes para os microrganismos responsáveis.

Neste trabalho, foram estudados 404 isolados de agentes etiológicos de mastite ovina. No que respeita à susceptibilidade das bactérias analisadas, dos 27 isolados de *Staphylococcus aureus*, apenas 4 (14%) se revelaram resistentes à penicilina. Este valor é inferior a todos os grupos de *Staphylococci* coagulase negativos incluídos neste estudo, os quais exibiram perfis de resistência à penicilina com percentagens entre 16% e 57,5%. Estudos de resistência à penicilina em estirpes provenientes de amostras de leite de ovelhas com mastite revelaram valores entre 0,8% (Mørk *et al.*, 2005) e 12% dos isolados (Gutierrez *et al.*, 1990). Porém, é mais frequente encontrar referências a valores bem mais elevados, quando se fala de resistência de *Staph. aureus* à penicilina de origem mamária em bovinos, 35% a 66,7% (Bexiga *et al.*, 2005a; Bolzoni *et al.*, 2005; Haveri *et al.*, 2005b; Sol *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005), apesar de terem sido já referidos valores de 6,7% de isolados resistentes com a mesma proveniência (Bengtsson *et al.*, 2005). A percentagem de estirpes, de origem humana, resistentes a este antibiótico é da ordem dos 80% (Todar, 2002).

Além da baixa resistência à penicilina apresentada, podemos verificar que todos os isolados de *Staph. aureus* em estudo foram bastante sensíveis à maioria dos antibióticos avaliados. Os resultados deste trabalho sugerem que as estirpes de *Staph. aureus* associadas a mastite ovina são mais susceptíveis a agentes terapêuticos do que outras estirpes associadas a patologias humanas ou animais, incluindo mastites bovinas (Todar, 2002; Bexiga *et al.*, 2005a; Bolzoni *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005; Sol *et al.*, 2005). Estes resultados estão de acordo com os resultados de Gutierrez e colaboradores (1990). Uma explicação possível para esta circunstância é o facto de muito frequentemente a mastite provocada por

Staph. aureus em ovelhas conduzir à morte do animal ou ao seu refugio. Desta forma, são eventualmente eliminadas dos efectivos animais as estirpes mais resistentes à terapêutica.

De uma maneira geral, as estirpes de SCN revelaram um perfil de resistência mais elevado do que as estirpes de *Staph. aureus*. Este aspecto tem-se verificado também em estirpes de SCN isoladas a partir de infecção intramamária em bovinos (Sampimon *et al.*, 2005b; Kaspar, 2006).

De entre as espécies de *Staphylococci* estudadas, os isolados de *Staph. epidermidis* apresentaram menor susceptibilidade aos agentes antimicrobianos avaliados, o que poderá contribuir para facilitar a permanência deste microrganismo como agente etiológico de mastite nos efectivos ovinos.

Os isolados de *Staph. xylosus* revelaram um padrão de resistência apreciável face à novobiocina, contrariamente às restantes espécies de SCN, comprovando outros resultados apresentados na bibliografia (Devriese, 1979; Gutierrez *et al.*, 1990). A resistência das bactérias a agentes antimicrobianos é considerado um factor de virulência. Alguns autores distinguem dois grupos de SCN com base na sua susceptibilidade à novobiocina: estirpes sensíveis, *Staph. epidermidis*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. simulans*, *Staph. hyicus*, *Staph. chromogenes* e estirpes resistentes, *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *Staph. cohnii*, *Staph. lentus* (Devriese, 1979; Gutierrez *et al.*, 1990), a que atribuem diferentes efeitos sobre a resposta inflamatória da glândula mamária. Às estirpes sensíveis à novobiocina (NSCNS) são imputados aumentos da CCS mais elevados nas MSC em ovelhas do que às estirpes resistentes à novobiocina (NRCNS) (Gonzalo *et al.*, 2002).

Os microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus* manifestaram uma elevada taxa de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos. Este aspecto teria já sido referido relativamente a *Streptococci* de origem mamária em ovinos (Winter e Baumgartner, 1998).

De salientar, também, é o facto de os isolados de *Streptococcus agalactiae* revelarem menor susceptibilidade à penicilina, do que o descrito em isolados de outros países (Erskine *et al.*, 2002). No presente estudo, 47% dos isolados não manifestaram susceptibilidade à penicilina. Contrariamente, as estirpes incluídas

neste estudo revelaram 24% de isolados resistentes às tetraciclinas, valor bastante inferior aos 50% de estirpes resistentes referidas noutro estudo (Kaspar, 2006).

De todos os grupos de microrganismos avaliados, as espécies de *Enterococci* exibiram menor susceptibilidade ao conjunto de agentes antimicrobianos estudados. Microrganismos pertencentes a este género, isolados a partir do leite de vacas com mastite são, frequentemente, mais resistentes aos agentes antibacterianos do que *Streptococci* (Rossitto *et al.*, 2002). Este aspecto torna-se mais relevante devido ao facto de ser frequente a transferência de genes de resistência de espécies de enterococos para outros microrganismos (Noble *et al.*, 1996). A transferência de genes de resistência para antibióticos pode ocorrer no organismo do consumidor (Lester *et al.*, 2005), levando ao aparecimento de estirpes de bactérias resistentes com importância em saúde pública.

O grupo dos bacilos Gram-negativos integra os agentes etiológicos de mastite ovina mais resistentes aos agentes antibacterianos abrangidos por este estudo. Isto deve-se, naturalmente, ao facto de mais de metade dos isolados incluídos neste grupo pertencerem à espécie *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria esta que é muito resistente à maioria dos antibióticos.

O teste de Friedman permitiu verificar que os dois antibióticos polipeptídeos inibidores da membrana citoplásmica, colistina e polimixina B, não têm actividades antimicrobianas *in vitro* semelhantes entre si, quando aplicados a *Staphylococcus epidermidis*, a *Staphylococcus aureus* e aos agentes patogénicos incluídos no grupo “outros SCN”. Nos laboratórios de análises clínicas, é prática corrente utilizar um antibiótico representante de uma classe de antibióticos e extrapolar os resultados de susceptibilidade obtidos para os outros fármacos da mesma classe. Os resultados do presente trabalho indicaram, para os isolados em estudo, que a extrapolação de resultados da colistina para deduzir a actividade antimicrobiana da polimixina B, ou *vice versa*, não é correcta. O facto de os resultados extrapolados poderem, muitas vezes, não corresponder à real susceptibilidade dos agentes patogénicos em estudo foi já referido (Constable e Morin, 2003).

Dentro do grupo dos antibióticos aminoglicosídeos, a actividade da estreptomicina apresenta diferenças significativas ($P < 0,05$) relativamente à actividade da gentamicina face a *Enterococcus* e a bacilos Gram-negativos. Estas diferenças são possivelmente devidas a diferentes susceptibilidades a enzimas capazes de inactivar aminoglicosídeos, facto que caracteriza os diferentes membros deste grupo (NCCLS, 2002).

Determinados enzimas responsáveis pela resistência aos antibióticos macrólidos, podem também provocar resistência a antibióticos do grupo das lincosamidas (Roberts *et al.*, 1999; Lüthje e Schwartz, 2006). No presente trabalho, quando comparadas as actividades antibacterianas do macrólido oleandomicina com a lincomicina, verificámos que não apresentam diferenças significativas ($P > 0,05$) contra *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, outros cocos Gram-positivos catalase negativos e bacilos Gram-negativos, tendo apenas apresentado diferenças face a outros SCN, a bacilos Gram-positivos e a *Enterococcus*.

Quando comparadas as capacidades antimicrobianas *in vitro* das sulfamidas e do trimetoprim, revelaram diferenças significativas face a *Staphylococcus epidermidis* ($P < 0,001$) e a bacilos Gram-negativos ($P < 0,05$). Com efeito, estes dois agentes quimioterápicos não têm o mesmo mecanismo de acção, visto que interferem em dois passos sequenciais no metabolismo do folato. Porém, não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) para os restantes SCN e para as estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Este trabalho incluiu a análise de susceptibilidade aos antibióticos, com o método de diluições, de 108 isolados de *Staph. epidermidis* e 22 de *Staph. aureus*. Este método é mais rigoroso do que o método de difusão e permite determinar a concentração inibitória mínima para cada estirpe. A técnica das microdiluições é extremamente morosa e a utilização do sistema Vitek 2 tem proporcionado resultados fiáveis com muito menor consumo de tempo (Ling *et al.*, 2001; Ligozzi *et al.*, 2002). A disponibilização de informação relativa à susceptibilidade antibiótica de agentes patogénicos é de todo o interesse para monitorizar a dinâmica dos padrões de susceptibilidade, prevenir a pressão de selecção para estirpes resistentes, protegendo a saúde animal e a saúde pública. No que

respeita a agentes etiológicos de mastite em ovelhas, este conhecimento será, também, muito útil para proporcionar uma profilaxia e tratamento eficazes.

Foram detectados três isolados de *Staph. epidermidis* e um de *Staph. aureus* resistentes à oxacilina. A resistência a este antibiótico indica a possibilidade de a bactéria produzir a proteína PBP 2a (*penicillin-binding protein 2a*), expressa pelo gene *mecA*, que confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos resistentes às β -lactamases. As estirpes de bactérias resistentes são designadas por resistentes à meticilina, por uma razão histórica, apesar de a meticilina já não ser utilizada para o teste de sensibilidade. Assim, a designação *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) refere-se a *Staph. aureus* resistentes aos β -lactâmicos resistentes às penicilinas.

Com o conhecimento da possibilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos entre microrganismos e a evidência de que a presença desses genes em estirpes de agentes patogénicos com importância veterinária pode constituir um risco para a saúde pública, nos últimos anos, tem-se pesquisado a presença de MRSA associados a animais de companhia e a animais de interesse pecuário (Weese, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2005). A pesquisa de resistência à meticilina em espécies de SCN adquiriu maior interesse depois de provada a possibilidade de transferência horizontal do gene *mecA* entre diferentes espécies de *Staphylococci* (Archer *et al.*, 1994). Num estudo que incidiu sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados a partir do leite de vacas com mastite subclínica, não foram detectadas estirpes de MRSA, no entanto, 29% (9 em 31) dos isolados de *Staph. epidermidis* apresentaram resistência à oxacilina e a presença do gene *mecA* foi evidenciada (Nunes *et al.*, 2006a).

O método utilizado para a detecção da resistência à oxacilina foi o sistema Vitek 2. Este sistema mostrou ser muito fiável para a detecção fenotípica da resistência à meticilina em SCN, com valores de sensibilidade entre 91% e 97,5%, tendo apresentado 98,7% de especificidade, quando comparado com a pesquisa do gene *mecA* (Horstkotte *et al.*, 2002; Aïsa *et al.*, 2004). A concordância entre os resultados obtidos para *Staphylococcus epidermidis* foi particularmente elevada (Horstkotte *et al.*, 2002).

Quanto à correlação dos resultados obtidos nos dois métodos de testes de sensibilidade aos antibióticos, verificou-se que a concordância foi elevada para a gentamicina (100% para *Staph. aureus* e 99% para *Staph. epidermidis*) e para a rifampicina (100% para *Staph. aureus* e 97,7% para *Staph. epidermidis*). Em ambos os casos foi utilizado o mesmo antibiótico nos dois testes. Além disso, não se verificou a existência de estirpes de *Staph. epidermidis* resistentes, quando aplicado o método de diluições, tendo sido detectadas, pelo método de difusão, apenas um isolado resistente à gentamicina e dois não susceptíveis à rifampicina. A concordância encontrada para a susceptibilidade à gentamicina de estirpes de *Staph. aureus* e *Staph. epidermidis* causadores de mastite subclínica em bovinos foi de, respectivamente, 84,6% e 79,3% (Nunes *et al.*, 2006b). Porém, o mesmo estudo revelou uma concordância de apenas 46,4% para isolados de *Streptococci* com a mesma origem.

Quando comparados os resultados dos dois testes respeitantes à penicilina, a concordância foi de 84,7% para *Staph. epidermidis* e 81,8% para *Staph. aureus*. Nunes e colaboradores (2006b), para estirpes de origem bovina, referem percentagens de concordância de 93,1% para os isolados de *Staph. epidermidis* e de 100% para *Staph. aureus*. No entanto, relativamente às estirpes de *Streptococci* que integraram o estudo referido, a concordância foi de 33,9%

As discrepâncias do tipo *very major error* indicam resultados falsos sensíveis pelo método de difusão. Relativamente à penicilina, estas foram encontradas apenas para os isolados de *Staph. epidermidis* e poderão dever-se a erros na técnica utilizada, designadamente ao uso de suspensão bacteriana com densidade inferior à indicada. As discrepâncias do tipo *major error* referem-se a falsos resistentes pelo método de difusão, tendo sido encontradas em ambas as espécies estudadas. A eventual utilização de discos de antibiótico alterados e com actividade diminuída poderá ser a causa destas discrepâncias. Efectivamente, os discos de penicilina degradam-se rapidamente após a abertura da embalagem.

Neste trabalho, foram comparados os resultados do teste de sensibilidade à cloxacilina, pelo método de difusão, com os resultados da susceptibilidade à oxacilina pelo método de diluições. A concordância foi de 95% para *Staph.*

epidermidis e de 95,5% para *Staph. aureus*. As discrepâncias do tipo *very major error* ocorreram para três isolados de *Staph. epidermidis* e um de *Staph. aureus*, portanto estirpes que revelaram sensibilidade à cloxacilina, foram resistentes à oxacilina. Estes resultados confirmam a indicação para utilização de discos de oxacilina e não de cloxacilina para testes de difusão (CLSI, 2006).

A comparação de susceptibilidade dos microrganismos estudados à oxitetraciclina, obtida pelo método de difusão, com a determinação das CIMs de tetraciclina para os mesmos microrganismos indicou 100% de concordância para *Staph. aureus* e 93,3% para *Staph. epidermidis*. O nível de concordância é elevado, considerando a grande variabilidade na susceptibilidade apresentada pelos isolados em estudo. A ocorrência de *major error* relativamente a cinco isolados de *Staph. epidermidis* poderá dever-se à utilização de discos de antibiótico alterados.

Verificou-se elevada discrepância, quando comparados os resultados obtidos para a lincomicina, pelo método de difusão, com os resultados da susceptibilidade à clindamicina. Os resultados por nós obtidos sugerem que a utilização de clindamicina como indicador para a susceptibilidade bacteriana à lincomicina não é aconselhável, apesar de ser preconizada por CLSI (2006). A utilização de antibióticos representativos de classe pode, efectivamente, dar indicações erradas sobre a terapia a seguir (Constable e Morin, 2003). Além disso, sabe-se que a lincomicina é menos activa do que a clindamicina face a algumas estirpes de *Staphylococci* (NCCLS, 2002).

Relativamente às sulfamidas e trimetoprim, verificou-se que a totalidade dos isolados de *Staph. epidermidis* foi sensível à associação destes dois agentes quimioterápicos, apesar de dois dos isolados terem revelado resistência a ambos os princípios activos, quando testados separadamente. Isto possivelmente deve-se à acção sinérgica das sulfamidas e do trimetoprim.

Os resultados do presente trabalho, interpretados à luz do estado do conhecimento, sugerem a associação medicamentosa de cloxacilina com neomicina como antibiótico de primeira escolha, a utilizar para profilaxia ou tratamento de mastite ovina. Para segunda escolha, será indicada a cefuroxima.

No entanto, não deverá ser negligenciada a necessidade de fazer análises bacteriológicas, bem como os respectivos testes de sensibilidade aos antibióticos, devendo uma amostra de leite para analisar, ser sempre colhida antes do início do tratamento.

O método de difusão como teste de sensibilidade aos antibióticos é amplamente utilizado, visto ser menos dispendioso e permitir obter resultados em menos tempo do que o método das diluições. Os resultados deste estudo sugerem que a sua utilização pode fornecer indicações sobre a terapêutica a utilizar, com uma fiabilidade bastante aceitável para *Staph. aureus* e *Staph. epidermidis*. É, porém, indispensável que seja efectuado rigorosamente de acordo com as indicações de CLSI (2006), tendo especial atenção à densidade bacteriana do inóculo e às condições de manutenção dos discos de antibiótico. Os resultados indicam que a utilização da oxacilina para indicar sobre a susceptibilidade à cloxacilina e a utilização da tetraciclina como indicador da oxitetraciclina são fiáveis. Contudo, os resultados da susceptibilidade à clindamicina não deverão ser extrapolados para a lincomicina.

É importante desenvolver estudos que contribuam para o conhecimento da real susceptibilidade dos agentes etiológicos de mastite. Para uma monitorização adequada dos padrões de susceptibilidade, é mais indicada a utilização do método de diluições para detecção das CIMs dos antibióticos face aos diversos microrganismos.

4 – PESQUISA DE FACTORES DE VIRULÊNCIA EM *Staphylococcus epidermidis*

4.1 – INTRODUÇÃO

Os resultados do rastreio de mastites em ovelhas, previamente efectuado, indicam que *Staphylococcus epidermidis* é o agente etiológico mais prevalente nos efectivos estudados, tanto nos casos de mastite subclínica, como nos casos de mastite clínica. Este microrganismo é frequentemente citado como o principal causador de MSC (De La Cruz *et al.*, 1994; Hofer *et al.*, 1995; Ziluaga *et al.*, 1998; Bergonier *et al.*, 1999; Las Heras *et al.*, 1999a; 1999c; Pengov, 2001, Ariznabarreta *et al.*, 2002), tendo sido também referido como principal causador de MC em ovinos (Hofer *et al.*, 1995).

A expressão de factores de virulência é fundamental para que esta bactéria tenha capacidade para invadir e se estabelecer na glândula mamária formando um foco de infecção.

A capacidade de produzir zoogleia tem sido considerada o principal factor de virulência de *Staph. epidermidis*. A produção desta matriz exopolissacarídica, que juntamente com as próprias bactérias constitui um biofilme, aumenta consideravelmente a aptidão para colonizar materiais inertes utilizados na constituição de próteses e outros implantes, justificando a alta incidência de infecções secundárias à sua implantação, causadas por este agente patogénico (Petrelli *et al.*, 2006).

No que respeita à patologia da glândula mamária, a produção de biofilme pelos agentes etiológicos tem sido referida como responsável por antibiorresistência e por provocar mastites persistentes (Fontaine e Smith, 2006). Relativamente à capacidade para se estabelecer na glândula mamária, qualquer microrganismo terá melhores possibilidades de produzir uma infecção, se conseguir aderir para colonizar o epitélio mamário contrariando, assim, o efeito de arraste exercido pelo fluxo de leite. Os resultados obtidos em alguns estudos indicam que a capacidade de certas estirpes de *Staph. aureus* para produzir biofilme lhes confere vantagem

para aderir às células do hospedeiro. Aguilar e colaboradores (2001) verificaram que a adesão de *Staph. aureus* a células do epitélio mamário de ovino *in vitro* aumenta significativamente se for mediada por exopolissacarídeo, não sendo intervenientes neste processo proteínas da membrana celular eucariótica. A inoculação intramamária, em ovelhas, de estirpes de *Staph. aureus* com capacidade para produzir zoogleia, revelou que estes microrganismos possuem uma capacidade para colonizar significativamente maior do que estirpes não produtoras de exopolissacarídeo (Baselga *et al.*, 1993).

Por outro lado, alguns estudos sugerem que a presença de matriz exopolissacarídica pode prejudicar a adesão bacteriana a células eucarióticas por mascarar moléculas de adesão na superfície da bactéria, impedindo a sua ligação aos respectivos componentes da matriz extracelular. Estirpes de *Staph. epidermidis*, provenientes de infecções secundárias ao implante de catéteres em humanos, foram utilizadas num ensaio de adesão a fibrinogénio e a fibronectina, tendo-se verificado que estirpes mutantes, não produtoras de biofilme, apresentaram uma aptidão para aderir aquelas proteínas significativamente superior aos isolados, produtores de biofilme, dos quais as primeiras foram obtidas (Baldassarri *et al.*, 1997). Identicamente, a estirpe capsulada de *Staph. aureus* Newman (NCTC 8178) manifesta uma capacidade de adesão a células endoteliais em cultura significativamente menor do que uma estirpe mutante sem competência para produzir polissacarídeo capsular (Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000).

A proteína associada ao biofilme (Bap) promove a acumulação de zoogleia. Cucarella e colaboradores (2002) compararam o comportamento de outra estirpe de referência de *Staph. aureus* com informação genética para a produção da Bap com uma estirpe delectada do gene *bap*, que tem maior capacidade de adesão ao fibrinogénio e à fibronectina. Os autores verificaram que a estirpe que não tem aptidão para produzir esta proteína tem maior capacidade para aderir a células do tecido conjuntivo da glândula mamária e tem maior capacidade para invadir células epiteliais em cultura. Porém, a capacidade de adesão a estas células não apresenta diferenças apreciáveis entre a estirpe original e a mutante. Após inoculação experimental das mesmas estirpes na glândula mamária de ovino,

constatou-se que a estirpe não produtora de Bap tem maior capacidade para colonizar na fase inicial. O mesmo grupo de trabalho, num ensaio realizado com estirpes de *Staph. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, observaram que os microrganismos possuidores do gene *bap*, não obstante revelarem menor capacidade para colonizar a glândula mamária ovina numa fase inicial, têm melhor aptidão para persistir neste local (Cucarella *et al.*, 2004). Neste estudo confirma-se que a capacidade para produzir a proteína Bap não interfere com a adesão a culturas de células epiteliais.

Estirpes bovinas de *Staph. epidermidis*, causadoras de mastite, têm sido referidas como produtoras de zoogleia (Watts *et al.*, 1990; Saa e Kruze, 1995). No entanto, não foram encontrados registos sobre a relação entre a produção de biofilme e a competência para aderir e para invadir células do epitélio mamário.

A produção de zoogleia, por bactérias que causam infecção intramamária, possivelmente influencia a magnitude da descarga de células somáticas visto que, em vacas com mastite causada por *Staph. aureus*, se verificou que estirpes que não possuem os genes responsáveis pela formação de biofilme induziram descargas celulares superiores a estirpes com informação genética para produzir zoogleia (Cucarella *et al.*, 2004).

A frequente produção de superantigénios por agentes etiológicos de mastite (Hájek e Maršálek, 1973; Hájek, 1978; Otero *et al.*, 1987; Bautista *et al.*, 1988; Orden *et al.*, 1992a; 1992b; 1992c; Fitzgerald *et al.*, 2000; Zschöck *et al.*, 2000; Akineden *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003; Suk-kyung *et al.*, 2004; De Santis *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2005; Zecconi *et al.*, 2006) tem suscitado a hipótese de estas exotoxinas terem um papel determinante na patologia da mastite (Ebling *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003).

No presente trabalho, isolados de *Staph. epidermidis*, provenientes de leite de ovelhas com mastite, foram analisados quanto à sua capacidade para produzir biofilme *in vitro*, utilizando dois métodos laboratoriais. Posteriormente, com o objectivo de pesquisar a influência da produção de biofilme sobre a capacidade das bactérias para aderir e invadir células do epitélio mamário de ruminante,

foram incubadas, em co-cultura, estirpes produtoras e estirpes não produtoras de biofilme com uma linha de células epiteliais de glândula mamária.

Para avaliar a influência da produção de zoogleia por *Staph. epidermidis* sobre a inflamação da glândula mamária, investigámos se em ovelhas com mastite causada por este agente patogénico, a descarga celular, estimada pelo teste californiano de mastites, difere consoante a estirpe responsável expressa ou não capacidade para produzir zoogleia.

Com a finalidade de investigar a ocorrência de estirpes de *Staph. epidermidis* produtoras de enterotoxinas e TSST envolvidas na mastite ovina e a sua eventual relevância sobre o processo inflamatório na glândula mamária, foram analisados vários isolados provenientes de animais que apresentaram diferentes graus de inflamação, conforme a respectiva reacção ao TCM.

4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 – Avaliação da capacidade para produção de biofilme em *Staphylococcus epidermidis*

A capacidade para produzir biofilme em *Staphylococcus epidermidis* foi avaliada em 109 isolados provenientes de glândulas mamárias de ovelhas, que apresentavam diferentes graus de inflamação, conforme sintomatologia apresentada e resultados do teste californiano de mastite (Tabela IX, Anexo I).

A totalidade dos isolados foi submetida a dois métodos para detecção da produção de biofilme. Um método qualitativo, no qual a detecção se baseia na expressão fenotípica das características das colónias produzidas em agar vermelho do Congo (CRA) (Freeman *et al.*, 1989), e um método quantitativo que permite quantificar o biofilme produzido em função da densidade óptica, após cultura em meio líquido contido em microplacas de 96 poços (adaptado de Cucarella *et al.*, 2002).

Método qualitativo

Cada isolado foi inoculado em *brain heart infusion broth* (BHIB) (Oxoid, CM225) e incubado a 37°C, durante cerca de 18 horas, em atmosfera normal. A partir destas culturas, foram inoculadas, por estria, placas de CRA (Anexo II). A incubação destas placas compreendeu um período de 24 horas, a 37°C, em atmosfera normal, seguido de um período de 24 horas, à temperatura ambiente, em atmosfera normal. Após a incubação, foi efectuado o registo do fenótipo observado: as colónias pretas foram consideradas produtoras de biofilme e as vermelhas como não produtoras. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe *Staph. epidermidis* ATCC 35984 (RP 62A), produtora de biofilme e, como controlo negativo a estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 12228, que não possui o operão para a produção de biofilme.

Método quantitativo

Este ensaio foi realizado seguindo um delineamento em blocos casualizados, utilizando como bloco o dia da determinação (Dia 1, Dia 2, Dia 3).

Para a avaliação quantitativa da produção de biofilme foi seguido o método descrito por Christensen *et al.* (1985) modificado por Cucarella *et al.* (2002), com ligeiras alterações. Cada isolado de *Staph. epidermidis* em estudo foi inoculado em *tryptone soya broth* (TSB) (Oxoid, CM129) e incubado durante cerca de 18 horas, a 37°C, em atmosfera normal. Estas culturas foram então diluídas a 1:40 em TSB. Volumes de 200 µl de cada amostra diluída foram distribuídos, em triplicado, em poços de fundo plano de microplacas de 96 poços. Como controlos, foram utilizadas as estirpes *Staph. epidermidis* ATCC 35984 (RP 62A), controlo positivo, e *Staph. epidermidis* ATCC 12228, controlo negativo, processados de igual forma. Além destes, um outro controlo negativo foi constituído por TSB não inoculado, igualmente em triplicado. Após incubação a 37°C, em atmosfera normal, durante 18 horas, os poços foram esvaziados e lavados 3 vezes com 200 µl de tampão fosfato salino pH 7 (PBS) (Anexo II). As placas foram secas na estufa a 60°C, em posição invertida, durante 1 hora. O biofilme produzido foi corado com 200 µl de cristal violeta a 0,25% em água destilada, durante 1 minuto, findo o qual o corante foi retirado e as placas lavadas 3 vezes com água corrente e secas na estufa a 37°C, durante cerca de 2 horas.

A densidade óptica foi lida a 565 nm num leitor de placas ELISA (Bio-Rad, modelo 680). Para cada isolado, o valor do resultado foi calculado subtraindo à média das leituras ópticas dos três poços respectivos, o valor da média das leituras ópticas obtidas nos três poços referentes à estirpe utilizada como controlo negativo na mesma microplaca, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Resultado} = \frac{\sum \text{DO1, DO2, DO3}}{3} - \frac{\sum \text{CN1, CN2, CN3}}{3}$$

Em que:

DO1, DO2, DO3 – densidade óptica da amostra no poço 1, 2 e 3, respectivamente

CN1, CN2 e CN3 – densidade óptica do controlo negativo no poço 1, 2 e 3, respectivamente

Este ensaio foi feito em triplicado, em três dias distintos.

Tratamento estatístico

O efeito da expressão fenotípica das colónias em CRA, na produção de biofilme em microplaca, foi estudada por análise de variância, utilizando o Proc GLM (SAS, 1991) e o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}, \text{ em que}$$

Y_{ijk} é a produção de biofilme

μ é a média geral

α_i é o efeito da expressão fenotípica (vermelho ou preto) i

β_j é o efeito do bloco (dia da determinação) j

ε_{ijk} é o erro

As diferenças de produção de zoogleia entre as classes do TCM foram analisadas por análise de variância utilizando o Proc GLM (SAS, 1991) e o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} é a produção de zoogleia

μ é a média geral

α_i é o efeito da classificação no teste californiano de mastites (A, B, C, MC, V) i

ε_{ij} é o erro

4.2.2 – Ensaio de adesão e de invasão de células do epitélio mamário

Os isolados de *Staph. epidermidis* utilizados nos ensaios foram escolhidos de acordo com a sua capacidade para produzir biofilme. Assim, foram seleccionados sete isolados que expressaram aptidão para produzir biofilme (200 E, 232 D, 239 D3, 256 E, 280 D, 287 D e 287 E) e cinco não produtores (192 D, 256 D, 280 E2, 304 D e 320 E). Como controlos, foram utilizadas as estirpes de referência *Staph. epidermidis* ATCC 35984 (RP 62A), produtora de biofilme e estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 12228, que não produz matriz exopolissacarídica.

Todos os isolados foram inoculados em placas de agar sangue e incubadas durante cerca de 18 horas, a 37°C, em atmosfera normal. A partir destas culturas, para cada isolado a testar, foi preparada uma suspensão de bactérias em meio de cultura de células (Anexo II) sem antibiótico com cerca de 1×10^6 células/mL. Estas suspensões foram preparadas após leitura óptica e com o recurso a uma

recta de regressão previamente elaborada que correlaciona a densidade óptica com a quantidade de unidades formadoras de colónia (UFC), conforme o método padronizado (U.S. FDA, 2001) de contagem de colónias em *plate count agar* (PCA) (Oxoid, CM325).

O número de microrganismos viáveis por mililitro (Ic), de cada suspensão, foi determinado com exactidão utilizando o mesmo método de contagem (Tabela XI, Anexo I).

Cultura de células

Neste trabalho, foi utilizada uma linha celular BME constituída por células epiteliais secretoras de glândula mamária de bovino, gentilmente cedida pelo Professor C. Buernich. As células foram cultivadas num meio de cultura indicado, conforme se descreve em anexo (Anexo II).

Para os ensaios, foram preparadas placas de cultura de células de 24 poços (Nunc, 122475) com 2×10^5 células por placa. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, durante seis dias, até se obter uma monocamada confluyente de células.

Ensaio de adesão

Depois de retirado o meio de cultura contendo antibióticos, de todos os poços nas placas com culturas celulares a utilizar no ensaio, as células foram lavadas três vezes com PBS, com períodos de incubação de 10 minutos, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, entre cada lavagem. As células foram inoculadas, em triplicado, com 1 mL de cada suspensão de bactérias. Em cada duas placas foram inoculadas células, também em triplicado, com o controlo positivo e com o controlo negativo, ficando em cada placa três poços não inoculados apenas com PBS. Duas placas sem células foram inoculadas segundo o mesmo esquema, para verificar a adesão das bactérias ao polistireno da placa, constituindo o ensaio de adesão à placa.

As placas com co-culturas, células e bactérias, e as placas apenas com cultura de bactérias foram incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ durante 35 minutos. Passado este tempo, as suspensões foram retiradas e as células, e poços das placas sem

células, foram lavados três vezes com PBS. Foram inoculados, em cada poço, 250 µl de Tripsina-EDTA 0,1% / 0,04% (Invitrogen, 25300-054), para destacar as células e as bactérias das paredes dos poços e as placas foram novamente incubadas durante 15 minutos. Com a finalidade de rupturar as membranas citoplasmáticas das células e para submeter as bactérias das placas sem células a um tratamento idêntico ao aplicado às aderentes a células, foram aplicados 250 µl de 0,1% de Triton-X (Sigma, T-8532), em cada poço, e as placas foram mais uma vez incubadas durante 10 minutos.

Procedeu-se à contagem das bactérias aderentes à placa e do total de bactérias aderentes e internalizadas pelas células BME. As misturas de lisado e suspensão foram cuidadosamente misturadas com a micropipeta e diluídas em PBS. Um mL da diluição 10^{-2} foi inoculado por incorporação, em duplicado, em PCA. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera normal durante 48 horas. O número de UFC foi determinado de acordo com o método padronizado para contagem de microrganismos viáveis (U.S. FDA, 2001).

O número de bactérias aderentes a células BME (Tabela XI, Anexo I) foi calculado da seguinte forma:

Foi inicialmente determinada a percentagem das bactérias inoculadas que aderem à placa – Pp

$$P_p = P \times 100 / I_p$$

Em que:

P – nº de bactérias aderentes à placa no ensaio de adesão ao material da placa

I_p – nº de bactérias no inóculo utilizado no ensaio de adesão à placa

Para determinar o número de bactérias aderentes a células, foi determinada a área total do poço ocupada pelo inóculo (A_{total}), sabendo que o diâmetro do poço é igual a 1,5 cm e que o inóculo corresponde a 1 cm³. Apenas a área da base do poço (A_{base}) será ocupada pelas células, de forma que as bactérias podem aderir à placa na área ocupada pela suspensão (A_{altura}), referente à altura do poço.

$$A_{total} = 8,395 \text{ cm}^2$$

$$A_{base} = 7,065 \text{ cm}^2$$

$$A_{altura} = 1,33 \text{ cm}^2$$

O número de bactérias na suspensão inoculada no poço com cultura de células (Ic) que deveria aderir à placa se não houvesse células – Bp será

$$B_p = P_p \times I_c$$

O número de bactérias que adere à placa por cm² – B será

$$B = B_p / A_{total} = B_p / 8,395$$

O número de bactérias inoculadas no poço com cultura celular que adere à parte do poço que não tem células, a altura do poço (A_{altura}) – Ba será

$$B_a = B \times A_{altura} = B \times 1,33$$

O número de bactérias que realmente adere às células (C), no fundo do poço, será igual ao número de bactérias contadas no ensaio de adesão a células (Bt) menos o número de bactérias que aderiram à parte do poço que não tem células (Ba) adicionado do número de bactérias que foram internalizadas pelas células (I), conforme os resultados do ensaio de invasão

$$C = B_t - (B_a + I)$$

A percentagem de bactérias contidas na suspensão inoculada que adere a células – Cp será

$$C_p = C \times 100 / I_c$$

Ensaio de invasão

Foram preparadas co-culturas de células BME e bactérias, conforme as utilizadas no ensaio de adesão. Após 35 minutos de incubação, nas condições descritas, as células foram lavadas três vezes com PBS. Depois, foi adicionado a cada poço 1 mL de solução de lisostafina (Sigma, L-7386) em meio de cultura de células (5 µg/mL) e as placas foram incubadas 2 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, com o objectivo de lisar as bactérias aderentes às células.

Depois da incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS. Para verificar a eficácia da lisostafina na inactivação das bactérias aderentes, o PBS utilizado na última lavagem de cada poço foi inoculado, por incorporação, em PCA e incubado a 37°C, em atmosfera normal, durante 48 horas para posterior contagem de colónias.

As células foram, então, tratadas com 250 µl de Tripsina-EDTA (0,1% / 0,04%) e as placas foram incubadas durante 15 minutos. Por fim, foi adicionado a cada poço 250 µl de 0,1% de Triton-X e as placas foram mais uma vez incubadas durante 10 minutos.

As misturas de lisado e suspensão foram inoculadas em PCA e incubadas a 37°C, em atmosfera normal durante 48 horas. A contagem de colónias resultantes, correspondente ao número de bactérias (número de UFC) que foram internalizadas pelas células BME, foi determinado de acordo com o método padronizado para contagem de microrganismos viáveis (U.S. FDA, 2001).

Relação entre o grau de inflamação, produção de biofilme e capacidade de adesão

Para verificar se a capacidade para aderir a células do epitélio mamário *in vitro* difere entre as estirpes produtoras e não produtoras de biofilme e a sua relação com a intensidade da reacção inflamatória produzida na glândula mamária, medida através do TCM, os dados foram estudados por análise de variância utilizando o Proc GLM do programa SAS (SAS, 1991) e o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + TCM_j + (B_i * TCM_j) + e_{ijk}$$

Sendo:

Y – a proporção de adesão a células do epitélio mamário *in vitro* da estirpe produtora de biofilme B_i que provocou uma intensidade de reacção inflamatória TCM_j

μ – a média

B_i – o efeito da produção de biofilme B_i

TCM_j – o efeito da intensidade da reacção inflamatória TCM_j

$B_i * TCM_j$ – o efeito da interacção entre a produção de biofilme B_i e a intensidade da reacção inflamatória TCM_j

e_{ijk} – o erro

O efeitos da interacção entre a produção de biofilme e a intensidade da reacção inflamatória não foi significativo tendo sido retirado do modelo de análise, mantendo-se apenas os efeitos principais.

4.2.4 – Pesquisa de superantigénios

Foram testados 27 isolados de *Staphylococcus epidermidis* originários de amostras de leite provenientes de ovelhas com mastite clínica ou mastite subclínica com diferentes descargas de células somáticas (reacções ao TCM, V, 1+, 2+ e 3+). Foram executados testes para detecção de enterotoxinas estafilocócicas, enterotoxina estafilocócica A (SEA), enterotoxina estafilocócica B (SEB), enterotoxina estafilocócica C (SEC) e enterotoxina estafilocócica D (SED) e também para detecção de toxina responsável pelo síndrome do choque tóxico (TSST).

Para detecção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, foi utilizado o método “SET-RPLA” (Oxoid, TD900) e, para detecção de toxina TSST, foi usado o método “Oxoid toxin detection, TST” (Oxoid, TD 940). O método aplicado baseia-se numa reacção de aglutinação passiva reversa em latex (*reversed passive latex agglutination test*), na qual são utilizadas partículas de latex revestidas com IgG de coelho específicas para cada toxina a detectar, que aglutinam na presença da respectiva toxina.

Cada isolado de *Staph. epidermidis* foi inoculado em BHIB (Oxoid, CM225) e incubado a 37°C, durante 18 a 24 horas, em atmosfera normal. Estas culturas foram filtradas através de membrana com porosidade 0,2 µm, com baixa adesão de proteínas (Acrodisc 4192, Gelman), e os filtrados obtidos foram utilizados na prova.

Foi utilizado um controlo negativo, fornecido com os testes, que corresponde a uma suspensão de partículas de latex revestidas com imunoglobulinas de coelho não específicas para as respectivas toxinas, um controlo positivo para cada toxina, também fornecidos com os respectivos testes, que correspondem a soluções das toxinas purificadas. Além destes, foram também utilizados como

controlos positivos, filtrados obtidos da mesma forma que as amostras em prova, de culturas de *Staphylococcus aureus* produtores de toxinas, designadamente a estirpe COL, produtora de SEB, a estirpe Fri 472, produtora de SED e a estirpe Fri 913, produtora de TSST, SEA e SEC, gentilmente cedidas pela Professora Hermínia de Lencastre.

4.3 – RESULTADOS

4.3.1 – Avaliação da capacidade para produção de biofilme em *Staphylococcus epidermidis*

Os resultados do método qualitativo foram interpretados com base na cor das colónias obtidas após incubação das culturas em agar vermelho do Congo (Fig. 2). As colónias vermelhas correspondem a estirpes não produtoras de biofilme e as colónias pretas são originadas por bactérias que produzem este exopolissacarídeo.



Figura 2: Placas com cultura em agar vermelho do Congo

1 - estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 12228, não produtora de biofilme; 2 - estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 35984 (RP 62A), produtora de biofilme; 3 - estirpe em estudo produtora de biofilme

As microplacas resultantes do teste quantitativo (Fig. 3) foram analisadas num leitor de placas de ELISA, cujos resultados de densidade óptica são apresentados na Tabela VIII (Anexo I).

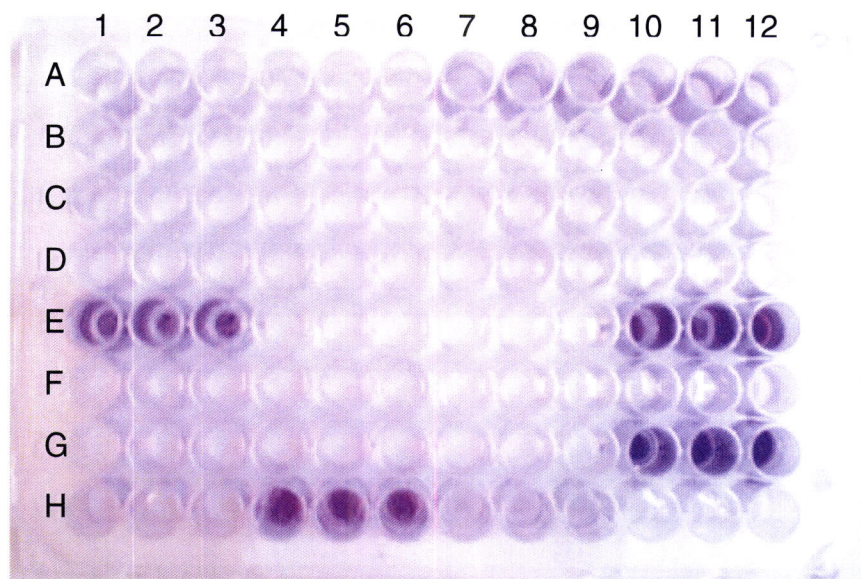


Figura 3: Microplaca com teste quantitativo

Linha H, colunas 4, 5 e 6 – estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 35984 (RP 62A), produtora de biofilme; colunas 7, 8 e 9 – estirpe de *Staph. epidermidis* ATCC 12228, não produtora de biofilme; colunas 10, 11 e 12 – meio TSB não inoculado

Dos 109 isolados de *Staphylococcus epidermidis* testados, apenas 8 revelaram capacidade para produzir biofilme, de acordo com o teste qualitativo.

Os valores obtidos como resultados do teste quantitativo, correspondentes a estirpes positivas no teste qualitativo que produzem colónias pretas, foram sempre superiores a zero. Os isolados que produzem colónias vermelhas só raramente (12 em 303 resultados) originaram valores superiores a zero, quando analisados segundo o método qualitativo (Tabela IX, Anexo I e Gráfico 22).

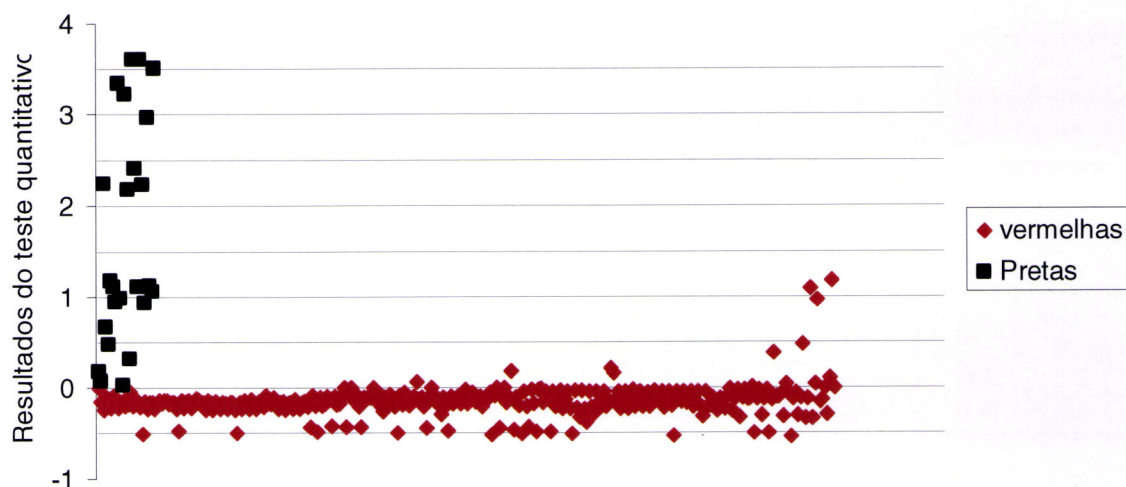


Gráfico 22: Teste quantitativo e respectivo fenótipo em CRA

Os resultados dos dois métodos utilizados para avaliação da produção de biofilme em relação com os resultados do TCM/MC estão representados na Tabela 30 e Tabela IX (Anexo I).

Tabela 30: Relação entre resultados do TCM e produção de biofilme

Intensidade da inflamação TCM/MC	Produção de biofilme		Nº de isolados
	Teste Qualitativo	Teste Quantitativo	
MC	V	≤ 0	6
	P	> 0	0
3+	V	≤ 0	34
	P	> 0	2
2+	V	≤ 0	31
	P	> 0	2
1+	V	≤ 0	4
	P	> 0	21
V	V	≤ 0	1
	P	> 0	7

V – colónia vermelha; P – Colónia preta; ≤ 0 – resultado inferior ou igual a zero em pelo menos 2 dos 3 dias; > 0 – resultado maior que zero em pelo menos 2 dos 3 dias (Tabela VIII, Anexo I)

O efeito da expressão fenotípica das colónias em CRA na produção de biofilme, quando analisado pelo teste das microplacas, foi altamente significativo ($P < 0,001$). As variações ocorridas nos diferentes dias não foram significativas (Tabela 31).

Tabela 31: Médias de quadrados mínimos para a produção de biofilme pelas colónias de diferente expressão fenotípica

	Vermelhas	Pretas	P (VP)	P (Dia)	DPR
N	295	24	-	-	-
Produção biofilme (unidade)	1.648	-0.148	***	NS	0.373

$R^2 = 0.620$

P= Probabilidade de significância do valor de F da análise de variância

VP = Expressão fenotípica

Dia = Bloco

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$, NS: não significativo.

DPR: Desvio padrão residual.

As diferenças de produção de zoogleia entre as classes do TCM/MC não apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$) (Tabela 32).

Tabela 32: Médias de quadrados mínimos para a produção de zoogleia pelas diferentes classes de TCM

	A	B	C	MC	V	P	DPR
N	64	108	107	17	23	-	-
Produção zoogleia (unidade)	-0.027	0.038	-0.067	-0.197	0.171	NS	0.601

$R^2 = 0.017$

P= Probabilidade de significância do valor de F da análise de variância

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$, NS: não significativo.

DPR: Desvio padrão residual.

Resultados do TCM – A – 1+; B – 2+; C – 3+; MC – mastite clínica; V – vestigial ou suspeito

4.3.2 – Ensaio de adesão e de invasão de células do epitélio mamário

A capacidade de adesão a células mamárias, *in vitro*, dos isolados produtores de biofilme (200 E, 232 D, 239 D3, 256 E, 280 D, 287 D e 287 E) e dos não produtores (192 D, 256 D, 280 E2, 304 D e 320 E) apresenta-se na Tabela 33. Este resultado é dado pelo número de células bacterianas que aderiu à monocamada de células BME, sob a forma logarítmica, e correspondente percentagem de bactérias, contidas na suspensão inoculada, que representa. Para cada isolado, apresenta-se igualmente o grau de inflamação, revelado pelo TCM, exibido pela glândula mamária de onde foi recolhido.

Tabela 33: Adesão de *Staph. epidermidis* a epitélio mamário

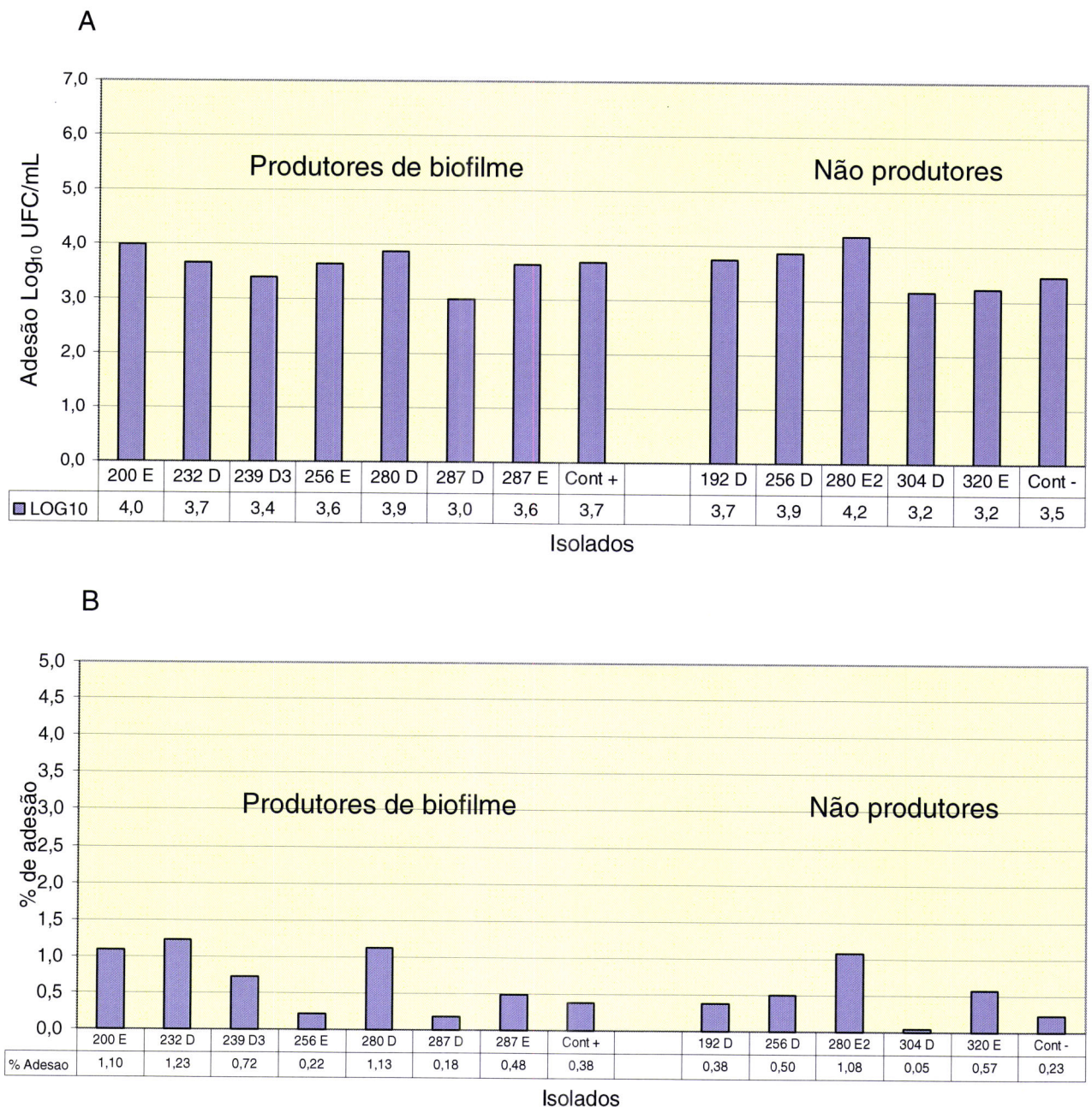
Isolados de *Staph. epidermidis* produtores e não produtores de biofilme, respectivos resultados de produção de biofilme, adesão e TCM

Isolado	Biofilme		Adesão		TCM
	Teste qualitativo	Teste quantitativo	Log ₁₀ UFC/mL	%	
200 E	+	> 0	4,0	1,10	2+
232 D	+	> 0	3,7	1,23	2+
239 D3	+	> 0	3,4	0,72	V
256 E	+	> 0	3,6	0,22	3+
280 D	+	> 0	3,9	1,13	2+
287 D	+	> 0	3,0	0,18	3+
287 E	+	> 0	3,6	0,48	2+
Cont +	+	> 0	3,7	0,38	
192 D	-	≤ 0	3,7	0,38	3+
256 D	-	≤ 0	3,9	0,50	2+
280 E2	-	≤ 0	4,2	1,08	2+
304 D	-	≤ 0	3,2	0,05	3+
320 E	-	≤ 0	3,2	0,57	1+
Cont -	-	≤ 0	3,5	0,23	

Cont + - controlo positivo; Cont - - Controlo negativo

O número de bactérias que aderiu a células do epitélio mamário em cultura variou entre 3,0 e 4,2 Log₁₀ por 7,065 cm² de monocamada celular (Gráfico 23 A). A percentagem de bactérias aderentes foi entre 0,05 e 1,23% das células

bacterianas contidas no inóculo (Gráfico 23 B). O número de bactérias aderentes dos isolados produtores de biofilme variou entre 3,0 e 4,0 Log₁₀, apresentando percentagens de adesão compreendidas entre 0,18 e 1,23%. Relativamente aos isolados não produtores, o número de bactérias que aderiu à camada celular variou entre 3,2 e 4,2 Log₁₀, cujas percentagens se situam entre 0,05 e 1,08%.



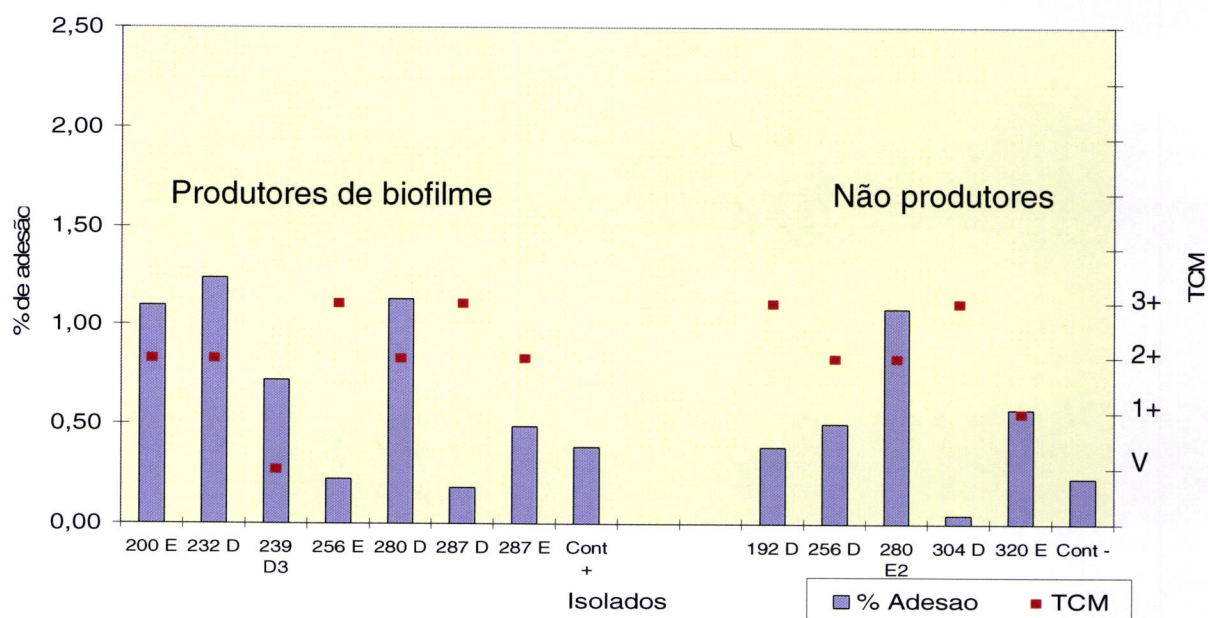
Cont + - controlo positivo; Cont - - controlo negativo

Gráfico 23: Adesão de *Staphylococcus epidermidis* a células epiteliais mamárias (BME)

Os isolados em estudo revelaram uma capacidade de invadir células mamárias, *in vitro*, muito reduzida. A percentagem de bactérias que foi internalizada, pelas células mamárias em co-cultura, não excedeu os 0,06% do total inoculado. Para a maioria dos isolados a percentagem de invasão foi nula ou quase nula (Tabela XI, Anexo I).

4.3.3 – Relação entre o grau de inflamação, produção de biofilme e capacidade de adesão

A relação entre a intensidade da inflamação produzida na glândula mamária ovina, pelos diferentes isolados de *Staph. epidermidis*, e a respectiva capacidade para aderir a células do epitélio mamário *in vitro* está representada no Gráfico 24.



Cont + - controlo positivo; Cont - - controlo negativo

Gráfico 24: Relação entre adesão a células BME e reacção ao TCM

Relativamente aos efeitos da produção de biofilme e da intensidade da reacção inflamatória na capacidade de adesão a células do epitélio mamário *in vitro*,

verificou-se que produção de biofilme não afecta a adesão nem o grau de inflamação está directamente relacionado com uma diferente capacidade de adesão (Tabela 34).

Estirpes com diferente capacidade de produção de biofilme não mostraram ter uma diferente capacidade para aderir a células do epitélio mamário. Da mesma forma, estirpes que deram origem a um grau de inflamação diferente não mostraram ter uma diferente capacidade para aderir a células do epitélio mamário.

Tabela 34: Efeitos da produção de biofilme e da intensidade da reacção inflamatória na capacidade de adesão

Médias ajustadas, erro padrão, coeficiente de determinação, desvio padrão residual e nível de significância

Variável independente	N	LSM ± EP
TCM		
0	0	---
V	1	-0.0012 ± 0.0404
+	1	0.0141 ± 0.0404
++	6	0.0248 ± 0.0162
+++	4	0.0021 ± 0.0192
Biofilme		
Estirpes produtoras	7	0.0184 ± 0.0188
Estirpes não produtoras	5	0.0015 ± 0.0202
	R2	0.191
	DPR	0.038
	P – TCM	0.7972 NS
	P - B	0.5233 NS

4.3.4 – Pesquisa de superantigénios

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, SEA, SEB, SEC e SED, e toxina responsável pelo síndrome do choque tóxico resultou negativa para todos os 27 isolados de *Staphylococcus epidermidis* testados (Tabela 35).

Tabela 35: Produção de superantígenos por *Staph. epidermidis*

Isolados	Efectivo	Reacção	Toxinas				
		TCM	TSST	SEA	SEB	SEC	SED
3E	1	3+	N	N	N	N	N
17E	1	MC	N	N	N	N	N
18D	1	MC	N	N	N	N	N
20E	1	MC	N	N	N	N	N
33E	2	3+	N	N	N	N	N
53E	3	3+	N	N	N	N	N
108D	4	3+	N	N	N	N	N
140D	6	MC	N	N	N	N	N
140E	6	MC	N	N	N	N	N
142E	6	3+	N	N	N	N	N
182E	11	3+	N	N	N	N	N
192D	13	3+	N	N	N	N	N
197D	"	3+	N	N	N	N	N
203D	"	2+	N	N	N	N	N
235D	11 (*)	2+	N	N	N	N	N
242E	"	1+	N	N	N	N	N
243E	"	2+	N	N	N	N	N
253D	13 (*)	2+	N	N	N	N	N
256E	"	3+	N	N	N	N	N
257D	"	S	N	N	N	N	N
278D	15	1+	N	N	N	N	N
287D	"	3+	N	N	N	N	N
295D	16	2+	N	N	N	N	N
298D	"	3+	N	N	N	N	N
304D	"	3+	N	N	N	N	N
315D	17	S	N	N	N	N	N
320E	"	1+	N	N	N	N	N
Fri 472	Estirpe controlo		N	N	N	N	+
Fri 913	Estirpe controlo		+	+	N	+	N
COL	Estirpe controlo		N	N	+	N	N

(*) – Isolados provenientes duma segunda colheita no efectivo anteriormente amostrado

4.4 – DISCUSSÃO

Cento e nove isolados de *Staphylococcus epidermidis*, provenientes de leite de ovelhas com mastite, foram submetidos a testes para avaliação da capacidade para produzir zoogleia. Para isso, foram utilizados dois métodos. O primeiro, consiste num método qualitativo, descrito por Freeman (1989), que se baseia no facto de as colónias obtidas a partir de bactérias que produzem zoogleia, quando cultivadas em agar vermelho do Congo, apresentarem coloração negra, contrariamente às resultantes de bactérias não produtoras, as quais se apresentam coradas de vermelho. O vermelho do Congo é um corante aniónico metacromático, indicador de pH com um intervalo de transição de pH 3,0 (azul/negro) a pH 5,0 (vermelho). O segundo método utilizado neste trabalho, descrito por vários autores como quantitativo, foi originalmente descrito por Christensen (1985). Este método tem sofrido várias adaptações por diversos investigadores, tendo sido, neste trabalho, ligeiramente modificada a adaptação de Cucarella (2002).

Dos 109 isolados em estudo, apenas 8 (7,3%) expressam capacidade para produzir este exopolissacarídeo, de acordo com os resultados obtidos no teste qualitativo.

Não foram encontradas referências a estudos em estirpes de origem ovina. Porém, a percentagem de estirpes de *Staph. epidermidis*, isoladas a partir de leite mastítico de bovino, com capacidade para produzir zoogleia pode variar entre 6,3% (Saa e Kruze, 1995) e 42,9% (Watts *et al.*, 1990). Num trabalho sobre estafilococos coagulase negativos, isolados de leite caprino, foi isolada apenas uma estirpe de *Staph. epidermidis*, a qual expressou capacidade para produzir zoogleia (Bedidi-Madani *et al.*, 1998). Nestes, tal como no presente estudo, apenas foram utilizados testes para avaliação fenotípica da capacidade de produzir zoogleia *in vitro*. Sabendo que diversos factores ambientais interferem na expressão desta aptidão, nomeadamente limitações em ferro (Fe) disponível, condições de anaerobiose, temperatura e osmolaridade, presença de etanol ou de concentrações subinibidoras de alguns antibióticos (Gotz, 2002) e visto que as

condições de laboratório não podem reproduzir a situação *in vivo*, é possível que algumas estirpes que apresentaram resultados negativos possam produzir biofilme em situações de infecção.

A baixa percentagem de isolados produtores de zoogleia, com origem em leite de ovelha com mastite, pode dever-se ao facto, sugerido por Heinzemann e colaboradores (1997), da existência de mecanismos de resistência, no organismo do animal hospedeiro, mais eficazes para estas estirpes do que para as não produtoras. Estes autores compararam a estirpe de referência, produtora de biofilme, *Staph. epidermidis* RP62A, com a sua variante não produtora, relativamente à sua susceptibilidade à fagocitose e adesão a polimorfonucleares neutrófilos de origem humana e respectiva produção de iões tóxicos de oxigénio (ROI). Verificaram que para as estirpes produtoras de zoogleia todos os parâmetros avaliados apresentaram valores superiores aos apresentados pelas estirpes não produtoras. Os autores concluíram que os mecanismos de defesa do hospedeiro combatem mais agressivamente as estirpes produtoras de zoogleia do que as não produtoras. Contrariamente ao que habitualmente é referido, atribuindo às estirpes produtoras de zoogleia maior virulência e responsabilidade por infecções prolongadas, segundo esta hipótese, as estirpes produtoras seriam mais eficazmente eliminadas do organismo hospedeiro.

Todos os isolados cujo resultado foi positivo, quando analisados com o método qualitativo, tendo produzido colónias pretas no agar vermelho do Congo, originaram valores corrigidos no teste quantitativo superiores a zero, nos três ensaios. Relativamente aos isolados negativos em CRA, que originaram colónias vermelhas, embora a maioria dos valores obtidos como resultado do teste quantitativo seja inferior a zero, seis isolados exibiram valor acima de zero em um dos três ensaios e três revelaram valor positivo em dois dos três ensaios (Tabela VIII, Anexo I). Assim, no total de 101 isolados responsáveis por colónias vermelhas, cada um sujeito a três ensaios, portanto em 303 resultados, apenas 12 exibiram valores superiores a zero. Este teste confirmou os resultados do teste qualitativo no caso das estirpes positivas. Não tendo havido perfeita concordância de resultados nos dois testes relativamente aos isolados negativos, a expressão

fenotípica das colónias no teste qualitativo, contudo, influencia significativamente ($P < 0,001$) o resultado do teste quantitativo.

Os valores obtidos no teste quantitativo são muito variáveis, não só entre diferentes isolados, como nos diversos ensaios para o mesmo isolado. Visto que estas variações não são devidas a variação entre os dias de ensaio, os diferentes blocos, aparentemente, a espessura de biofilme produzido não depende de diferenças na capacidade de cada estirpe para produzir zoogleia. Estas variações na espessura do biofilme produzido serão, possivelmente, devidas ao facto de haver alguma disparidade na quantidade do inóculo introduzido nos diversos pocilhos. Efectivamente, seguindo a metodologia utilizada, podem ocorrer pequenas diferenças no número de microrganismos inoculados, as quais reverterão em diferenças apreciáveis devido ao tipo de crescimento logarítmico das bactérias.

Alguns autores utilizam este método para avaliar a maior ou menor capacidade de diferentes estirpes para produzir biofilme, tendo inclusivamente sido utilizada, como factor de correcção, a densidade óptica produzida nos pocilhos não inoculados, contendo apenas meio de cultura (Vasudevan *et al.*, 2003). Estes autores consideram positivos todos os resultados com $DO > 0,1$, não tendo utilizado nenhuma estirpe não produtora de zoogleia como controlo negativo. No presente trabalho verifica-se que a estirpe de referência *Staph. epidermidis* ATCC 12228, não produtora de biofilme, produz geralmente resultados de DO superiores a este valor (Tabela VIII, Anexo I).

Quanto ao efeito da capacidade para produzir biofilme sobre a intensidade da reacção inflamatória que se produz na glândula mamária em resposta à respectiva infecção, não foi possível verificar qualquer influência. Os resultados obtidos não revelaram qualquer relação entre a aptidão da bactéria para produzir zoogleia e a descarga de células somáticas no leite, de acordo com o teste californiano de mastites. Estes resultados não confirmaram os apresentados anteriormente, nos quais se verificou que estirpes não produtoras de zoogleia provocam uma descarga celular menos apreciável do que estirpes produtoras (Baselga *et al.*, 1993; Cucarella *et al.*, 2004).

A aptidão das bactérias para aderir ao epitélio da glândula mamária pode facilitar a colonização e o estabelecimento de uma infecção. Por outro lado, a capacidade para internalizar as células do epitélio mamário concede aos microrganismos refúgio face aos variados mecanismos de defesa do organismo hospedeiro. Vários estudos científicos avaliaram a capacidade de diferentes géneros e espécies de bactérias para aderir e para invadir células epiteliais. Na bibliografia consultada, porém, não foi encontrado qualquer registo referente à avaliação de *Staph. epidermidis* isolados a partir do leite de ovelha com mastite.

No presente trabalho, para averiguar se as estirpes de *Staph. epidermidis* causadoras de mastite em ovinos têm capacidade para aderir e/ou invadir as células do epitélio mamário, foram desenvolvidos ensaios *in vitro* para os quais foi utilizada uma linha de células de epitélio mamário bovino, BME. A utilização de linhas celulares relativamente a culturas primárias tem a vantagem de produzir resultados com maior repetibilidade (Belkum *et al.*, 2002).

Dos doze isolados de *Staph. epidermidis*, provenientes de infecções intramamárias em ovelhas, que foram inoculados em monocamadas de células epiteliais de glândula mamária BME, 0,05% a 1,23% das bactérias contidas no inóculo aderiu às células, após 35 minutos de incubação em co-cultura. A percentagem de bactérias que aderiu às células variou consoante o respectivo isolado. O valor da adesão de uma estirpe de *Staph. epidermidis* isolada a partir de leite mastítico de bovino, após 30 minutos de incubação em co-cultura com uma linha celular de origem mamária, foi de 2,4% (Almeida e Oliver, 2001). Os mesmos autores averiguaram a capacidade de adesão a células em *Staph. xylosus* e *Staph. hyicus*, tendo concluído que a adesão progride com o tempo de incubação, atingindo o máximo aos 120 minutos, e ainda que *Staph. xylosus* exibiu melhor capacidade para aderir, apesar de apenas apresentar uma percentagem de adesão de 0,27% aos 30 minutos. No trabalho referido foi utilizada uma linha celular de células de epitélio mamário diferente da usada no presente ensaio, o que poderá justificar as diferenças visto que também quando são utilizadas culturas primárias se verificam divergências na capacidade de adesão da mesma estirpe relativamente a células provenientes de diferentes animais (Sutra e Poutrel, 1994).

No que respeita aos ensaios para averiguar a capacidade de *Staph. epidermidis* de origem mamária em ovinos para invadir as células epiteliais da glândula mamária, os resultados obtidos revelaram uma capacidade *in vitro* quase nula, não tendo excedido o valor de 0,06% das bactérias inoculadas a ser internalizadas pelas células. Almeida e Oliver (2001), relativamente à já referida estirpe, apresentam os resultados da invasão em Log₁₀ UFC/ml e não em percentagem, não sendo possível apreciar o real valor da invasão após 30 minutos de incubação das co-culturas. Segundo estes autores, tal como acontece para a adesão, também a invasão progride com o tempo de incubação, atingindo o máximo aos 120 minutos. Num outro estudo, uma estirpe de *Staph. epidermidis* originária de infecção intramamária bovina revelou 1,75% de invasão após 2 horas em co-cultura (Anaya-López *et al.*, 2006).

Importa referir que, nas condições deste ensaio, alguns dos isolados em estudo se revelaram resistentes à lisostafina, que foi o agente bactericida utilizado para lisar as bactérias aderentes à cultura celular, de forma a contabilizar apenas as bactérias com localização intracelular (Tabela X, Anexo I). O método aqui utilizado foi o descrito para estafilococos coagulase negativos de origem mamária (Almeida e Oliver, 2001). Os mesmos autores, num trabalho prévio com *Staph. aureus*, concluíram que a lisostafina deu melhores resultados do que a gentamicina (Almeida *et al.*, 1996), que é utilizada por alguns investigadores para inactivar os estafilococos aderentes às células (Bayles *et al.*, 1998). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de avaliar a utilização de outros agentes bactericidas, a utilizar em ensaios para avaliação da capacidade de *Staph. epidermidis* para invadir células em cultura.

Relativamente à relação entre a capacidade para produzir biofilme e a aptidão para aderir e/ou invadir células eucarióticas, os resultados obtidos sugerem não haver interferência da capacidade de produzir biofilme exibida por algumas estirpes de *Staph. epidermidis* sobre a aptidão desses microrganismos para aderir a células de epitélio mamário. O mesmo resultado foi obtido num estudo relativo a *Staph. aureus* de origem mamária em bovinos (Cucarella *et al.*, 2004). Igualmente se verificou não existir qualquer relação entre a capacidade para produzir biofilme e a competência para invadir células de epitélio mamário em cultura. No entanto,

não foram encontrados registos sobre a relação entre a produção de biofilme por *Staph. epidermidis* causadores de mastite em ruminantes e a competência para aderir e para invadir células do epitélio mamário.

Para avaliar a produção de superantigénios por estirpes de *Staph. epidermidis* causadores de mastite ovina, foi utilizado o método imunológico que se baseia numa reacção de aglutinação passiva reversa em latex. Foram pesquisadas as enterotoxinas estafilocócicas, SEA, SEB, SEC e SED e toxina responsável pelo síndrome do choque tóxico.

O presente estudo incidiu sobre 27 isolados de *Staph. epidermidis* provenientes de leite de ovelhas que apresentavam diferentes graus de inflamação na glândula mamária, de acordo com a sintomatologia apresentada ou os resultados obtidos no teste californiano de mastites. Dos isolados que integraram este trabalho, 5 foram originários de animais com mastite clínica, 12 de glândulas com reacção 3+ ao TCM, 5 cuja reacção ao TCM foi 2+, 3 respeitante a TCM 1+ e 1 isolado de um leite com resultado vestigial ou suspeito. Verificou-se que nenhum dos 27 isolados de *Staph. epidermidis* em estudo produziu qualquer dos superantigénios pesquisados.

A produção de superantigénios por estafilococos de origem mastítica é frequentemente referida relativamente a estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados a partir do leite de bovinos, ovinos e caprinos (Hájek e Maršálek, 1973; Hájek, 1978; Otero *et al.*, 1987; Bautista *et al.*, 1988; Orden *et al.*, 1992a; 1992b; Fitzgerald *et al.*, 2000; Zschöck *et al.*, 2000; Akineden *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003; Suk-kyung *et al.*, 2004; De Santis *et al.*, 2005a; Haveri *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2005; Zecconi *et al.*, 2006) e também a espécies de *Staphylococci* coagulase negativos (Bautista *et al.*, 1988; Orden *et al.*, 1992a; 1992c; Kuroishi *et al.*, 2003). No que se refere especificamente a estirpes de *Staphylococcus epidermidis* de origem mamária em ovelhas, foram encontradas referências a produção de TSST-1 / TSST-O (Ho *et al.*, 1989; Orden *et al.*, 1992a; 1992c) e, num estudo sobre a produção de enterotoxinas por *Staphylococci* isolados de leite ovino, de 6 isolados de *Staph. epidermidis*, 3 revelaram produzir SEC, 2 dos quais também produziam SEB e SED (Bautista *et al.*, 1988). Vários estudos sugerem, inclusivamente, a

hipótese de a produção de superantigénios influenciar a patologia da mastite (Ebling *et al.*, 2001; Kuroishi *et al.*, 2003; Haveri *et al.*, 2005a).

Os resultados do presente trabalho revelaram que algumas estirpes de *Staphylococcus epidermidis* causadoras de mastite em ovelhas podem produzir biofilme *in vitro*. Porém, também sugerem que esta característica não interfere nem com a capacidade dos microrganismos para aderir às células do epitélio mamário, nem com a intensidade da inflamação produzida na glândula mamária.

Todos os isolados de *Staph. epidermidis* analisados no ensaio de adesão revelaram capacidade para aderir a células mamárias em cultura. Uma maior ou menor capacidade de adesão, porém, não revelou qualquer influência sobre o grau de inflamação estabelecido na glândula mamária.

No presente estudo não foi detectada a produção de superantigénios por estirpes de *Staph. epidermidis* causadoras de mastite ovina. No entanto, a expressão deste factor de virulência deverá ser investigada num número superior de estirpes isoladas de situações clínicas e subclínicas de doença.

5 – ESTUDO DE PROTEÍNAS IMUNORRELEVANTES DE *Staphylococcus epidermidis* E REACÇÃO HUMORAL ESPECÍFICA EM OVELHAS INFECTADAS NATURALMENTE

5.1 – INTRODUÇÃO

A elevada prevalência de mastite verificada nos efectivos ovinos explorados para a produção de leite justifica a instituição de medidas profilácticas. A aplicação de regras de higiene durante a ordenha é, sem dúvida, fundamental para reduzir o acesso de microrganismos à glândula mamária. Também o tratamento de secagem com antibióticos, utilizado actualmente no maneio profiláctico de mastites em bovinos, já demonstrou ser eficiente no controlo de mastites em pequenos ruminantes (Hueston *et al.*, 1989; Ahmad *et al.*, 1992b; Tietze *et al.*, 1993; Cuccuru *et al.*, 1999; McDougall e Anniss, 2005). Porém, esta prática exerce uma pressão de selecção para estirpes resistentes a antibióticos (Boutet e Lekeux, 2005; Rajala-Schultz *et al.*, 2005) e deverá ser utilizada com precaução.

A profilaxia e o tratamento de mastites com recurso a estimulação dos mecanismos de defesa da glândula mamária serão uma alternativa bastante aliciante à utilização de agentes antimicrobianos, visto terem a vantagem de ser mais ecológicos e de proteger a saúde pública. Porém, embora existam trabalhos experimentais através dos quais foi possível melhorar a capacidade de resistência à infecção intramamária, nenhuma vacina já desenvolvida oferece níveis de protecção considerados desejáveis.

A chamada vigilância imunológica (*immune surveillance*) na glândula mamária é desenvolvida por células fagocitárias, nomeadamente macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos, que têm a função de destruir e eliminar os agentes invasores (Paape *et al.*, 2000). Quanto mais rápida e eficiente for esta depuração, menor será a extensão dos danos causados ao epitélio mamário e a evolução para a cura será favorecida (Oviedo-Boyso *et al.*, 2006; Rainard e Riollot, 2006). No leite, os fagócitos perdem eficiência devido à ingestão de glóbulos de gordura e caseína (Berthon e Salmon, 1993). A opsonização de bactérias pela fracção

C3b do complemento ou por imunoglobulinas aumenta a eficiência da fagocitose, a qual é ainda mais potencializada se os dois tipos de opsoninas actuarem em conjunto (Roitt *et al.*, 1993).

Os anticorpos são as opsoninas mais eficientes (Tizard, 2004). O isotipo de imunoglobulina mais abundante no leite de ruminantes é a imunoglobulina IgG (Kehrli e Harp, 2001), que é, também, a principal opsonina (Watson, 1989). Desenvolver uma forma de conseguir níveis eficientes de IgG no leite, capaz de reconhecer os agentes etiológicos de mastite, tem sido o móbil de muitos estudos e ensaios científicos (Amorena *et al.*, 1994; Tomita *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2001). Porém, embora a IgA exista em baixas quantidades na glândula mamária de ruminantes, é, por excelência, a imunoglobulina das mucosas e a sua função primordial de exclusão imunitária, unicamente exercida por este isotipo de imunoglobulina (Nickerson, 1989a), pode eventualmente ter um valor importante na defesa da glândula mamária.

O objectivo do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento de proteínas imunorrelevantes em *Staphylococcus epidermidis*, com a finalidade eventual de desenvolver antigénios a utilizar na profilaxia de mastites em ovelhas.

O estudo da resposta imunológica na glândula mamária ovina, face à infecção por agentes causadores de mastite, é fundamental para desenvolver estratégias de estimulação das defesas do hospedeiro com vista à profilaxia de mastites.

Na tentativa de colaborar na construção de métodos profilácticos de mastite mais eficazes, foi desenvolvido um trabalho para avaliar a resposta imunológica humoral sistémica e local na glândula mamária ovina, face à infecção pelo agente etiológico de mastite mais frequente nesta espécie.

5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foram analisados 14 isolados de *Staph. epidermidis* de origem mamária recolhidos de ovelhas com mastite. Foram escolhidas ovelhas provenientes de diversos efectivos animais, que apresentavam infecção intramamária uni ou bilateral causada unicamente por *Staphylococcus epidermidis*.

Inicialmente, as bactérias foram lisadas e submetidas a electroforese para separação das proteínas conforme o seu peso molecular. As proteínas assim separadas foram sujeitas a reconhecimento por parte de imunoglobulinas no sangue e no leite de ovelhas com mastite comparativamente a ovelhas saudáveis.

Foi avaliada a resposta humoral sistémica, através do reconhecimento dos antigénios proteicos por IgG específica no sangue, e a reacção local na glândula mamária, através do reconhecimento por IgG e por IgA no leite, em ovelhas infectadas e ovelhas saudáveis.

5.2.1 – Extracção de proteínas

O método utilizado para a extracção de proteínas foi descrito por Bedidi-Madani *et al.* (1993) com ligeiras alterações.

As estirpes, mantidas em BHIB (Oxoid, CM225) com 50% de glicerol, congeladas a -20°C , foram inoculadas em BHIB e incubadas a 37°C , durante 24 a 48 horas, em atmosfera normal. Foram, depois, inoculadas por estria em placas de AS (Oxoid, CM271 com 5% de sangue de ovino) e incubadas a 37°C , durante 24 horas, em atmosfera normal.

Depois de confirmada a sua pureza, toda a cultura foi retirada com uma zaragatoa esterilizada e inoculada em 25 mL de BHIB e incubada durante 24 horas, a 37°C , em atmosfera normal.

Após este período, as culturas foram centrifugadas a 10 000 X g durante 15 minutos, a 4°C. Depois de retirado o sobrenadante, o depósito foi lavado em 10 mL de água destilada estéril e centrifugado novamente a 2 500 X g durante 15 minutos, a 20°C. O depósito foi, então, suspenso em 1 mL de água destilada esterilizada e a mistura novamente centrifugada a 9 000 X g durante 5 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi eliminado e o depósito posto em suspensão em 0,7 mL de água destilada estéril, fortemente agitado e depois passado para um microtubo de 1,5 mL de capacidade, onde foram adicionados 30 µl de uma solução (10 mg/mL) de lisostafina (Sigma, L-7386). Após agitação, os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante cerca de 18 horas.

Foram, então, adicionados 50 µl de solução de 20% de SDS (Sigma, L-3771). Para completar a lise bacteriana, os tubos foram levados a ebulição em banho-maria durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 13 000 X g durante 15 minutos, a 20°C e o sobrenadante recolhido com uma seringa e, por último, filtrado através de uma membrana de porosidade 0,2 µm de diâmetro (Acrodisc 4192, Gelman).

Os extractos proteicos foram conservados em congelação a -20°C até posterior utilização.

5.2.2 – Doseamento de proteínas

A proteína presente nos extractos proteicos foi doseada utilizando o *kit* de Lowry modificado para determinação de proteína (modificação de Peterson do método Micro-Lowry) (Sigma, P-5656).

5.2.3 – Separação das proteínas por electroforese

Para separar as diferentes fracções proteicas nos extractos bacterianos, foi seguido o método descrito por Laemmli (1970) para electroforese em gel de poliacrilamida em condições reduzidas (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide*

gel electrophoresis, SDS-PAGE), utilizando o equipamento Protean II xi Cell (Bio-Rad).

Foram preparados geles de separação com 10% de acrilamida-bisacrilamida, com 1,5 mm de espessura (Anexo II). Após polimerização, durante cerca de 30 minutos, foi colocado por cima, um gel de concentração com 4% de acrilamida-bisacrilamida (Anexo II).

As 14 amostras de extractos proteicos foram adequadamente diluídas em água desionizada de forma a serem utilizadas 20 µg de proteína por poço. Foram depois ajustadas, para perfazerem um volume de 20 µl de mistura por poço, com tampão redutor de amostra contendo SDS e 2-mercaptoetanol (Anexo II). Foram, por fim, fervidas durante 1 minuto.

Em cada gel, foram distribuídos os 14 extractos bacterianos e um marcador de pesos moleculares com 6 proteínas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa e 29 kDa (Sigma, SDS-6H).

Os geles foram corridos em tampão Tris-glicina-SDS (pH 8,3) (Anexo II) com corrente constante de 25 mA por gel, para o gel de concentração, e de 35 mA por gel, para o gel de separação, até a linha de corante atingir o limite inferior do gel.

Os geles contendo o perfil proteico dos 14 isolados em estudo foram sujeitos a transferência electroforética ou corados, durante cerca de 18 horas, com solução de azul de Coomassie (Anexo II) e, depois, clarificados na solução descorante (Anexo II) até as bandas proteicas contrastarem com um fundo transparente.

5.2.4 – Transferência electroforética

As proteínas bacterianas separadas em função do seu peso molecular foram transferidas para membranas de nitrocelulose, segundo o método de Towbin *et al.* (1979).

Os geles de poli-acrilamida foram primeiro equilibrados em tampão de transferência (pH 8,3) (Anexo II) durante 30 minutos. A transferência foi

executada num aparelho Trans-Blot Cell (Bio-Rad) com corrente contínua de 30 V e processou-se durante cerca de 14 horas.

As membranas contendo as proteínas microbianas foram submetidas a *immunoblotting* ou coradas, durante 5 minutos, numa solução de amido *black* (Anexo II) e depois descoradas, durante 1 hora, numa solução descorante (Anexo II).

5.2.5 – Preparação dos soros

Os soros sanguíneos utilizados, provenientes de sangue recolhido no dia anterior, deixado à temperatura ambiente, foram obtidos por centrifugação a 2 000 X g, durante 15 minutos. Foram depois filtrados, através de membrana com 0,20 µm de porosidade, com baixa adesão de proteínas (Acrodisc 4192, Gelman) e congelados a -20°C em microtubos esterilizados até à sua utilização.

Para a preparação dos soros de leite, as amostras de leite colhidas assepticamente, foram, inicialmente, centrifugadas a 4°C, a 26 890 X g, durante 1 hora. Foi retirada a camada de gordura e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Este foi novamente centrifugado nas mesmas condições, durante 1 hora. Os soros de leite assim obtidos foram, então, submetidos a filtrações seriadas através de membranas com baixa adesão de proteínas, com poros com diâmetro de 5µm (Acro 50A 4264, Gelman), 0,45µm (Acro 50A 4262, Gelman) e, por fim, 0,20µm (Acro 50A 4260, Gelman), distribuídos em microtubos esterilizados e congelados a -20°C até serem utilizados.

5.2.6 – *Immunoblotting*

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas bacterianas foram incubadas durante 20 minutos, em 5% (peso/volume) de leite em pó magro, para bloquear o excesso de pontos de ligação na membrana e, depois, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) (Anexo II) com 0,5% de Tween 20 (Sigma, P-7949).

Após este processo, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, durante 8 horas, com os diferentes soros de ovinos. A detecção de IgG específica para os isolados em estudo foi pesquisada em:

- 4 soros sanguíneos de ovelhas com mastite subclínica causada por *Staph. epidermidis*, diluídos a 1:50;
- 2 soros sanguíneos de ovelhas saudáveis, diluídos a 1:50, utilizados como controlo negativo;
- 5 soros de leite de ovelhas com mamite subclínica a *Staph. epidermidis*, diluídos a 1:25;
- 2 soros de leite de ovelhas saudáveis, diluídos a 1:25, utilizados como controlo negativo.

A pesquisa de IgA específica incidiu sobre:

- 5 soros de leite de ovelhas com mamite subclínica a *Staph. epidermidis*, diluídos a 1:25;
- 2 soros de leite de ovelhas saudáveis, diluídos a 1:25, utilizados como controlo negativo.

Uma membrana foi incubada apenas com PBS, constituindo um outro controlo negativo.

Depois deste período, as membranas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween durante 10 minutos.

Para a pesquisa de IgG, tanto nos soros sanguíneos, como nos soros de leite, as membranas foram incubadas a 4°C com um soro anti-IgG de ovino e caprino conjugado com peroxidase (Sigma, A-9452), durante cerca de 14 horas. A diluição utilizada foi de 1:5 000.

Para a detecção da presença de IgA específica no soro de leite, foi utilizado um método indirecto. As membranas foram primeiro incubadas a 4°C, durante cerca de 14 horas, com soro de ratinho anti-IgA de ovino e caprino (Serotec, MCA628) diluído a 1:500 e, depois de lavadas com PBS-Tween, como anteriormente

descrito, foram novamente incubadas com soro de coelho anti-ratinho conjugado com peroxidase (Zymed, 61-6520) diluído a 1:2 000, durante 8 horas, à temperatura ambiente.

Após este procedimento, as membranas foram novamente lavadas três vezes com PBS-Tween e uma quarta lavagem só com PBS.

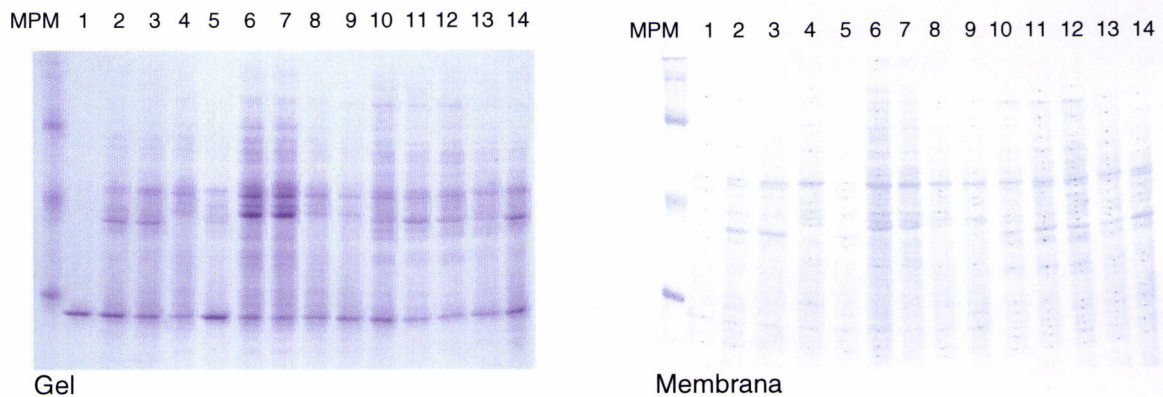
A visualização dos epitopos reconhecidos foi realizada por reacção enzimática cromogénica com DAB (3,3'-diaminobenzidina), utilizando um método rápido (Sigma, D-4293), deixando as membranas mergulhadas na solução durante 2 minutos e imediatamente lavadas em água desionizada durante 10 minutos. Por fim, foram secas com papel de filtro.

5.2.7 – Determinação do peso molecular das proteínas

Para determinação do peso molecular das proteínas correspondentes às diferentes bandas visualizadas, os geles corados, as membranas de nitrocelulose coradas e as membranas com *immunoblotting* foram digitalizadas, após o que foram analisadas com recurso ao programa Kodak 1D Digital Science (Eastman Kodak).

5.3 – RESULTADOS

A observação do gel com os extractos proteicos, após coloração com azul de Coomassie, tal como a observação da membrana de nitrocelulose, corada com amido *black*, permitem definir dois padrões proteicos diferentes para os 14 isolados de *Staphylococcus epidermidis* em estudo. Os isolados 1, 2, 3, 5, 10, 11, 12, 13 e 14 apresentam um padrão proteico e os isolados 4, 6, 7, 8 e 9 exibem um conjunto de proteínas diferente das primeiras (Fig. 4).



MPM- marcador de pesos moleculares (29, 45, 66, 97, 116 kDa); 1 a 14 – extractos proteicos dos 14 isolados de *Staph. epidermidis*.

Figura 4: Perfil proteico de *Staph. epidermidis*

Proteínas totais em gel de poliacrilamida e em membrana de nitrocelulose

Os resultados dos *immunoblots* revelaram que uma grande variedade de proteínas bacterianas é reconhecida por imunoglobulinas IgG no sangue de ovelhas tanto mastíticas como saudáveis, IgG no leite de ovelhas mastíticas e IgA no leite de ovelhas mastíticas e sãs. No entanto, algumas destas proteínas parecem estar presentes em todos os isolados em estudo e são reconhecidas por imunoglobulinas tanto no sangue como no leite de uma forma constante. Proteínas com peso molecular 59-60 kDa e proteínas com 43 a 46 kDa são reconhecidas por todas as imunoglobulinas pesquisadas, tanto no sangue como no leite, em ovelhas sãs e doentes (Tabelas XII, XIII e XIV, Anexo I). No leite das

ovelhas estudadas, foram ainda detectadas com insistência, IgG e IgA capazes de reconhecer proteínas com peso molecular entre 35-37 kDa (Fig. 5; Tabelas XIII e XIV, Anexo I).

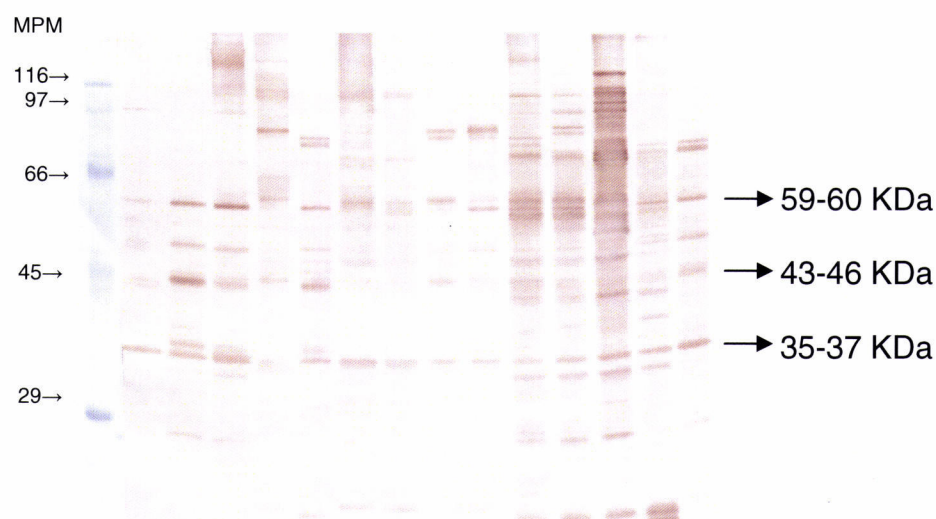


Figura 5: *Immunoblot* com soro de leite de ovelha mastítica para detecção de IgG

A banda proteica, correspondente a proteínas de peso molecular 25 kDa, bem evidente no gel (Fig. 4), é reconhecida por IgG presentes no sangue e no leite e por IgA presente no leite, mas não de uma forma constante. Esta variação não está relacionada com o facto de o animal estar ou não afectado de mastite (Tabela 36).

Tabela 36: Resposta à proteína estafilocócica com 25 kDa

Ovelhas	Sangue		Leite			
	IgG +	IgG-	IgG+	IgG-	IgA+	IgA-
Mastíticas	2	2	2	3	3	2
Saudáveis	2	0	NA	NA	1	1

Quando comparamos a reacção exibida por ovelhas infectadas face a ovelhas saudáveis, podemos verificar que nas membranas obtidas da conjugação dos

extractos bacterianos com os soros sanguíneos, o perfil de bandas de proteínas reconhecidas por IgGs circulantes é muito variado, aparecendo um padrão de bandas relativamente equivalente tanto nos soros de ovelhas com mastite como nos soros das duas testemunhas negativas (Fig. 6).

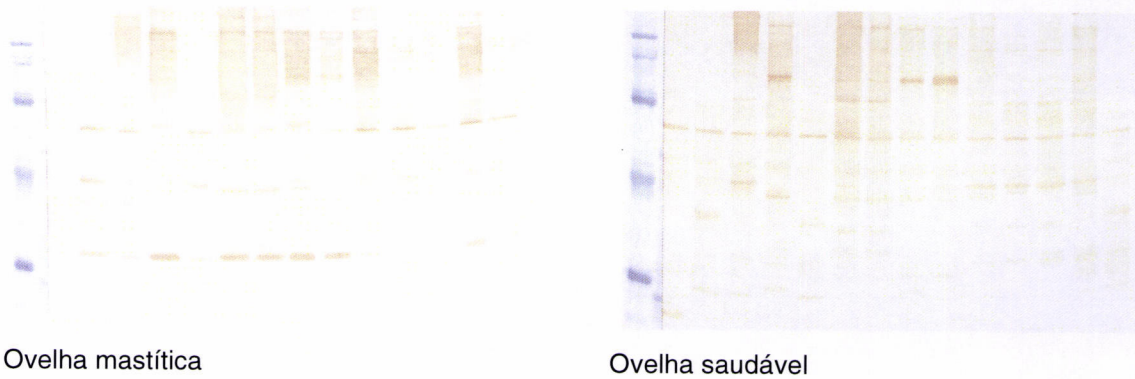


Figura 6: Proteínas de *Staph. epidermidis* reconhecidas por IgG no sangue

Nos *immunoblots* realizados, verificámos a presença de epitopos reconhecidos por IgA presente no leite, tanto de animais infectados como de animais de controlo (Fig. 7).

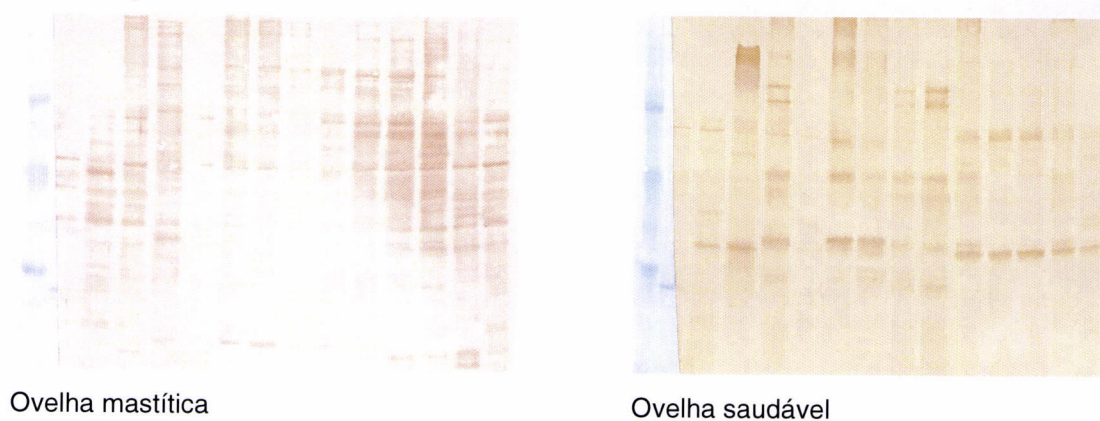


Figura 7: Proteínas de *Staph. epidermidis* reconhecidas por IgA no leite

Em relação aos ensaios para pesquisa de epitopos reconhecidos por IgG no soro de leite, verificámos que estes apenas foram detectados utilizando leite de ovelhas com mastite. Contrariamente ao observado relativamente a IgG no sangue e IgA no leite, nas membranas incubadas com o soro de leite das ovelhas sãs, que serviram de controlo negativo, não foram visíveis quaisquer bandas, apresentando a membrana de nitrocelulose um resultado semelhante ao da membrana incubada apenas com PBS (Fig. 8).

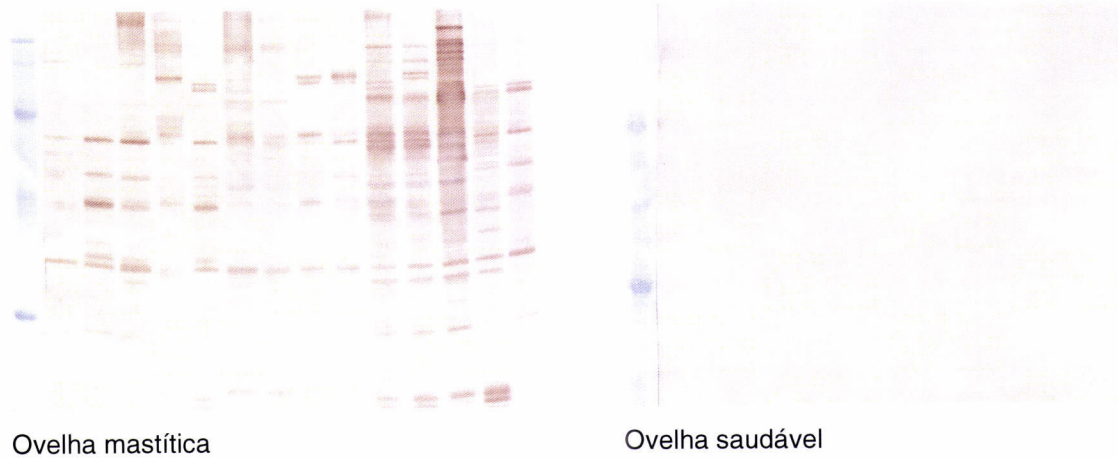


Figura 8: Proteínas de *Staph. epidermidis* reconhecidas por IgG no leite

5.4 – DISCUSSÃO

O objectivo do presente trabalho foi contribuir para a caracterização de antigénios em isolados de *Staph. epidermidis* responsáveis por mastite ovina. A identificação de proteínas imunorrelevantes em agentes etiológicos de mastites, e o estudo do seu efeito sobre a resposta imunológica nos animais, poderá fornecer indicações sobre a sua eventual utilização para estimulação da resposta imunológica. Este estudo pretendeu contribuir para o conhecimento de antigénios proteicos de *Staph. epidermidis*, na perspectiva de os equacionar como antigénios vacinais passíveis de integrar a constituição de vacinas para a profilaxia de mastites em ovelhas.

Para a separação e identificação das proteínas presentes nos lisados bacterianos, o método utilizado foi a electroforese em gel de poliacrilamida, após desnaturação por acção de dodecil-sulfacto de sódio (SDS-PAGE). Com esta metodologia, é possível, após transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose, avaliar o seu reconhecimento por imunoglobulinas presentes em diferentes líquidos orgânicos. Além disso, o método tem a vantagem de permitir recuperar as proteínas a partir das membranas de nitrocelulose, as quais poderão ser utilizadas como antigénios para diferentes fins.

Verificámos que o perfil de proteínas dos diferentes isolados de microrganismos, reconhecidas por anticorpos das ovelhas, não é constante. No entanto, as proteínas com pesos moleculares 35-37 kDa, 43-46 kDa e 59-60 kDa estão presentes em todos os microrganismos estudados e foram reconhecidas por imunoglobulinas existentes tanto nas ovelhas infectadas como nas de controlo. Os resultados sugerem que estas proteínas, constituintes de *Staphylococcus epidermidis* causador de mastite em ovelhas, poderão ser antigénios proteicos interessantes do ponto de vista imunogénico.

As proteínas 43-46 kDa e 59-60 kDa foram reconhecidas por anticorpos sanguíneos, além de anticorpos presentes no leite. Porém, as proteínas 35-37

kDa não foram consistentemente reconhecidas por anticorpos sanguíneos, mas sim por imunoglobulinas existentes no leite das ovelhas em estudo.

As proteínas referidas induziram, nos animais em estudo, uma resposta imunitária humoral específica, com produção de imunoglobulinas, IgG e IgA. A presença de IgG na glândula mamária é essencial para opsonizar o agente patogénico, de forma a melhorar a eficiência das células fagocitárias (Watson, 1989). Por outro lado, para contrariar a colonização do epitélio mamário, levando à eliminação do agente patogénico, através do processo de exclusão imunológica, a presença de IgA é de relevante importância (Nickerson, 1989a). Assim, a estimulação da produção e acumulação destas imunoglobulinas na glândula mamária poderá contribuir para aumentar a capacidade de resistência na glândula e será reduzida a probabilidade de se desenvolver uma mastite.

A estimulação da glândula mamária com antígenos proteicos poderá resultar numa protecção eficaz face aos agentes patogénicos. As proteínas imunorrelevantes identificadas neste trabalho poderão eventualmente ser consideradas como antígenos vacinais.

A evolução na tecnologia e o desenvolvimento de vacinas de nova geração permitem, hoje em dia, o fabrico de vacinas de subunidades que contêm como antígeno, não o microrganismo completo, mas apenas os epitopos desejados. Foi descrita uma vacina para mastite estafilocócica em ovelhas, cujo antígeno é o exopolissacarídeo da bactéria, que utiliza como adjuvante liposomas, um tipo de adjuvante particulado (Amorena *et al.*, 1994).

As vacinas constituídas por antígenos polissacarídicos são importantes para induzir anticorpos que irão opsonizar e melhorar a eliminação de estirpes de *Staphylococci* que possuam uma camada exopolissacarídica no momento da invasão da glândula mamária. Porém, algumas estirpes não produzem exopolissacarídeo e mesmo as estirpes produtoras poderão estar numa fase de não produção. A utilização de antígenos proteicos, eventualmente associados ao antígeno polissacarídico, poderá contribuir para tornar a vacina mais eficiente por conferir imunidade face a uma maior variedade de estirpes de *Staphylococci*.

É possível produzir proteínas com epitopos determinados a partir de extractos purificados de microrganismos, proteínas recombinantes de engenharia genética ou até produzir as proteínas sinteticamente (Gwynne e Heebner, 2005). Recentemente, foi referido um estudo de antigénios vacinais para combate de mastite bovina, no qual foi produzida uma estirpe de *E. coli* recombinante que expressa uma quimera de genes que traduz duas proteínas de *Staph. aureus* indutoras de anticorpos protectores (Perez-Casal *et al.*, 2005).

As proteínas, só por si, podem não ser suficientemente imunogénicas e as vacinas de subunidades necessitam, geralmente, de adjuvantes, compostos estes que têm a função de aumentar o estímulo produzido pela vacina de forma a induzir uma resposta imunitária mais forte e mais duradoura (Tizard, 2004). Os liposomas, especificamente, são utilizados como adjuvantes em vacinas para mastite em ovelhas (Amorena *et al.*, 1994). Estes são adjuvantes particulados que melhoram a apresentação do antigénio, estimulando a produção de citocinas pela célula apresentadora de antigénio, por sua vez aumentando a resposta dos linfócitos T *helper*, e, assim, potenciam tanto a resposta celular como a produção de anticorpos (Tizard, 2004). A metodologia imunopotenciadora deste tipo de adjuvantes utiliza complexos hidrofóbicos de proteínas, glúcidos ou lípidos que melhoram o tamanho efectivo, orientação e características físicas do antigénio de forma a torná-lo mais eficientemente reconhecido e processado pelo sistema imunológico (Lowell, 1990).

Visto que a tecnologia de vacinas actualmente disponível permite a opção de utilizar, como antigénios vacinais, apenas os epitopos considerados relevantes para induzir a resposta protectora pretendida, é necessário identificar esses epitopos.

Relativamente à resposta imunológica observada nos animais estudados, a análise dos *immunoblots* feitos com soro sanguíneo sugere que a mastite subclínica por *Staph. epidermidis* não desencadeou uma resposta humoral geral específica. Objectivamente, a panóplia de IgG específicas é muito variada, tanto nas ovelhas sãs como nas ovelhas com mastite, e não foi encontrado um padrão de epitopos bacterianos reconhecidos nas cinco ovelhas mastíticas que se diferencie do padrão exibido nos animais do controlo. A presença de IgG

específica para *Staph. epidermidis* no soro sanguíneo de animais saudáveis deve-se, provavelmente, ao facto de haver repetidos estímulos devido a feridas ou escoriações, que são frequentes nos animais, visto que os SCN integram a microbiota da pele. Este estudo, porém, incidiu sobre um número restrito de animais e não foram realizadas análises quantitativas que permitam detectar um eventual acréscimo de anticorpos nos animais mastíticos relativamente aos animais saudáveis. Outros autores referem uma resposta humoral geral após imunização intramamária em bovinos, com aumento de IgG no soro sanguíneo (Chang *et al.*, 1981).

Verificou-se a presença de IgG e de IgA no leite capazes de reconhecer proteínas bacterianas que não são reconhecidas por IgG no sangue. Aparentemente, as proteínas estafilocócicas de peso molecular 35-37 kDa estimularam uma resposta na glândula mamária ovina mas não induziram a formação de anticorpos circulantes. Este facto sugere a sua relevância em termos de resposta local.

Foi observada a existência de IgA específica para os antigénios estafilocócicos no leite de ovelhas saudáveis e de ovelhas mastíticas. O padrão de bandas proteicas reconhecidas por IgA nos dois grupos de animais é semelhante, sugerindo que também nos animais não infectados existe um reconhecimento destes antigénios. No entanto, nos *immunoblots* em que foram testados leites de ovelhas com mastite, foi reconhecido um maior número de bandas proteicas, provavelmente devido a uma resposta na glândula mamária com produção de IgA, após a estimulação local resultante da infecção por *Staph. epidermidis*.

Contrariamente ao que se verificou relativamente à IgA, no leite das ovelhas saudáveis não foi possível detectar o reconhecimento de proteínas de *Staph. epidermidis* por IgG. Apenas nos animais mastíticos se constatou o reconhecimento, dos antigénios bacterianos em estudo, por este isotipo. Os resultados sugerem uma resposta específica à presença de *Staph. epidermidis* na glândula mamária, provavelmente resultante do transporte e/ou produção local de IgG.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os resultados de um estudo, realizado por ELISA, em que foram quantificadas imunoglobulinas no leite de

ovelha (Vilela, 1993). Neste estudo, foram detectadas elevadas quantidades de IgA específica para proteínas extraídas da parede celular de *Mannheimia haemolytica*, conjuntamente com reduzidas quantidades de IgG com a mesma especificidade (respectivamente 372,45 e 0,26 unidades arbitrárias) no leite de ovelhas livres de mastite. Após infecção intramamária, produziu-se um aumento acentuado de IgG específica no leite, o qual foi muito superior ao que se verificou na resposta induzida através de hiperimunização por via sistémica.

O facto de as proteínas de *Staph. epidermidis* apenas serem reconhecidas por IgG presente no leite de animais com mastite, e não em animais saudáveis, sugere que é necessário um estímulo local intenso, com subsequente inflamação, para induzir a formação deste isotipo na glândula mamária. Esta hipótese é corroborada pela constatação, por outros investigadores, de que a resposta imunológica resultante de uma imunização local da glândula mamária é mais eficiente do que a vacinação por via sistémica, resultando numa profilaxia das mastites mais eficiente (Colditz e Watson, 1985).

No leite produzido por uma glândula mamária sã de ovelha, a IgG é a imunoglobulina que existe em maior quantidade, em concentrações de 60 a 100 mg/dL, face a 5 a 12 mg/dL de IgA (Tizard, 2004). No entanto, os nossos resultados não demonstraram a presença de IgG específica para o principal agente de mastite ovina, no leite das ovelhas não infectadas. Este facto levanta a hipótese de apesar de existir em níveis muito inferiores à IgG, a IgA ser a imunoglobulina que assegura a protecção humoral na glândula mamária numa primeira fase após a infecção. Efectivamente, este isotipo é, por excelência, a imunoglobulina das mucosas e é principalmente especializado no processo denominado exclusão imunitária, através do qual a imunoglobulina se liga ao respectivo epitopo, evitando a sua ligação às células epiteliais e obrigando à expulsão do antigénio pelo fluxo das secreções para o exterior do organismo animal.

A mucosa mamária é estéril, não possui microbiota residente, contrariamente a outras mucosas como o tubo digestivo ou as vias respiratórias superiores (Rainard e Poutrel, 1993). Como tal, a presença de IgA específica para proteínas de *Staph. epidermidis* no leite de animais saudáveis poderá dever-se a contactos

anteriores deste microrganismo com a mucosa da glândula mamária, visto que faz parte integrante da flora normal da pele humana, sendo o seu acesso ao interior da glândula facilitado pela ordenha. Estes contactos resultaram na presença local de células de memória capacitadas para a produção de IgA específica ou, eventualmente, na recirculação de linfócitos B efectores/de memória, pertencentes a um dos sistemas de imunidade local.

Os resultados obtidos sugerem que proteínas de 35-37 kDa de *Staph. epidermidis* se poderão vir a revelar interessantes como antigénios vacinais a utilizar no controlo de mastite ovina. Porém, será necessário investigar se os anticorpos induzidos são efectivamente protectores.

Relativamente à protecção da glândula mamária face aos agentes causadores de mastite, os resultados deste estudo sugerem que a IgA poderá ter um papel preponderante na vigilância imunitária. Além disso, estes resultados indicam a via intramamária como via de administração preferencial para vacinas anti-mastitíficas.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 – CONCLUSÕES

A prevalência média de mastite clínica encontrada no presente estudo foi de 1,7%, tendo os valores, para os diferentes rebanhos, variado entre 0% e 8,1%. Este valor, porém, refere-se a prevalência pontual.

A prevalência média de mastite subclínica foi de 32,2%, situando-se os valores individuais para os diversos efectivos entre 1% e 92,5%.

A prevalência de mastite foi superior em ovelhas ordenhadas mecanicamente relativamente aos animais sujeitos a ordenha manual, tendo-se verificado em ambas as formas, clínica e subclínica. Este facto sugere a possibilidade de o equipamento de ordenha utilizado ser frequentemente responsável por um aumento da susceptibilidade da glândula mamária.

Não foi possível, com os resultados obtidos comprovar a possível interferência da raça sobre a prevalência de MSC.

O teste californiano de mastite apresentou um índice de Youden baixo para qualquer ponto *cut off* considerado, sendo o valor mais elevado (0,4) para o grau 1+ do TCM. Tal significa que não foram obtidos, simultaneamente, valores de sensibilidade e de especificidade elevados. Contudo, trata-se de um teste de diagnóstico de baixo custo e de fácil execução, que pode ser utilizado pelos próprios produtores para avaliar a situação sanitária dos animais relativamente a mastites. Apesar de o índice de Youden indicar o grau 1+ como ponto *cut off*, sugere-se a utilização da reacção V como limite entre um teste positivo e um negativo, visto que mais de 50% das glândulas que exibiram esta reacção apresentaram infecção intramamária bacteriana.

O agente etiológico de mastite ovina mais frequentemente identificado foi *Staphylococcus epidermidis*, o qual foi isolado de 25% das amostras de leite de animais com MC e de 30,4% das amostras referentes a ovelhas com MSC.

De uma forma geral, as espécies de *Staphylococci* coagulase negativas foram responsáveis por 42,9% dos casos de MC e por 70,1% das ocorrências de MSC.

Staph. aureus foi isolado de 17,9% das amostras de leite provenientes de casos de MC e de 6,2% das relativas a casos de MSC. Este aspecto é importante em termos de saúde pública. Uma vez que a MSC não é detectável sem o auxílio de meios auxiliares de diagnóstico, passando despercebida aos produtores, o leite de animais afectados, contendo os respectivos microrganismos responsáveis, é introduzido na cadeia alimentar.

Além dos mencionados, merecem destaque os seguintes agentes etiológicos de mastite ovina isolados durante o presente estudo:

Arcanobacterium pyogenes foi isolado a partir de 4 amostras de leite proveniente de ovelhas com MC (14,3%) e de 2 amostras de animais com MSC (0,6%). Apesar de não ser frequente o seu envolvimento na patologia da glândula mamária ovina, este microrganismo é, aparentemente, muito patogénico, tendo induzido uma resposta inflamatória muito exuberante.

Streptococcus agalactiae pode provocar MC e MSC em ovelhas. Este microrganismo foi isolado a partir de 2 amostras de leite (7,1%) de animais com MC, e de 15 amostras (4,2%) recolhidas a animais com MSC. Apesar de ser pouco frequente a sua associação com mastites ovinas, pode provocar surtos de MSC com uma prevalência elevada. No presente trabalho, representou 40% dos agentes etiológicos de MSC isolados em um dos efectivos estudados. As infecções intramamárias por *Streptococcus agalactiae* provocam involução dos ácinos e fibrose do tecido inter-alveolar com consequente perda de função secretora nas lactações seguintes. Além deste aspecto, os isolados em estudo revelaram ser menos susceptível à penicilina do que habitualmente é referido na bibliografia.

As espécies de *Enterococci* representaram 4,6% dos agentes etiológicos de MSC, tendo *Enterococcus faecalis* correspondido a 3,4%. A associação destes microrganismos a MSC em ovelhas pode ser relevante em termos de saúde pública, visto que se revelaram muito resistentes aos agentes antimicrobianos

avaliados, podendo eventualmente transferir genes de resistência a outros microrganismos no leite ou mesmo no tubo digestivo do consumidor.

As espécies de *Corynebacteria* foram responsáveis por MSC em 18 ocasiões, representando 5,1% dos agentes etiológicos desta forma de afecção. Porém, o seu efeito sobre a glândula mamária ovina induziu uma resposta inflamatória pouco exuberante.

Pseudomonas aeruginosa provocou um dos casos de MC e foi responsável por 2,3% dos casos de MSC, tendo estado presente em cinco dos rebanhos estudados. A sua elevada resistência aos agentes antimicrobianos e o seu poder patogénico conferem-lhe especial relevância como causador de mastite ovina.

Relativamente à susceptibilidade dos agentes etiológicos de mastite ovina aos agentes antimicrobianos, os isolados de *Staph. aureus* revelaram-se mais sensíveis à penicilina do que é habitualmente referido na bibliografia, ao contrário dos isolados de *Strep. agalactiae*, que exibiram menor susceptibilidade do que é habitual. Este facto assume particular importância face à recomendação de utilização de penicilina para erradicar mastites causadas por este microrganismo em efectivos de bovinos leiteiros (Pyörälä, 2002), devendo a abordagem terapêutica ser re-equacionada no caso de efectivos ovinos.

As espécies de SCN, em geral, e de *Staph. epidermidis*, em especial, apresentaram um perfil de resistências aos antibióticos superior aos isolados de *Staph. aureus*. Este aspecto pode contribuir para a elevada frequência destes agentes etiológicos de mastite em ovelhas.

De salientar, é o facto de terem sido isoladas estirpes de *Staph. epidermidis* e de *Staph. aureus* resistentes à metilina.

As espécies de bacilos Gram-negativos estudadas revelaram-se particularmente resistentes aos agentes antibacterianos, tendo as espécies de *Enterococci* evidenciado menor susceptibilidade ao conjunto de antibióticos incluídos no presente estudo.

Os resultados sugerem que o antibiótico cloxacilina poderá ser o antibiótico de primeira escolha para o controlo de mastite ovina. A associação deste princípio

activo com um antibiótico aminoglicosídeo em preparações medicamentosas poderá ser bastante valiosa para o tratamento e profilaxia de mastites em ovelhas. A gentamicina revelou ser o antibiótico deste grupo com melhor acção face aos agentes patogénicos estudados. Porém, a utilização de neomicina poderá ser a escolha mais correcta, visto que, ao contrário da gentamicina, não deprime a fagocitose. O agente antimicrobiano aconselhado para segunda escolha poderá ser a cefuroxima.

Para análises clínicas e como indicador terapêutico, o teste de sensibilidade aos antibióticos de *Staph. aureus* e de *Staph. epidermidis* poderá ser feito utilizando o método de difusão, que apresentou resultados relativamente fiáveis. Contudo, a determinação da concentração inibitória mínima pode fornecer indicações mais precisas e necessárias para estudos de dinâmica de susceptibilidade dos agentes etiológicos de mastite ovina.

De acordo com os resultados obtidos, a cultura em agar vermelho do Congo é um método fiável para avaliar a produção de biofilme em estirpes de *Staph. epidermidis*, visto que o efeito da expressão fenotípica das colónias em CRA na produção de biofilme, quando analisado pelo teste das microplacas, é altamente significativo ($P < 0,001$). Por outro lado, o método das microplacas, vulgarmente chamado método quantitativo, não se revelou adequado para quantificar a capacidade para produzir esta matriz extracelular, embora possa servir como teste qualitativo, ou seja, com o mesmo valor que a cultura em CRA.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a capacidade para produzir biofilme *in vitro* por *Staph. epidermidis* não influencia a resposta inflamatória na glândula mamária, pois as diferenças de produção de zooglia entre as classes do TCM/MC não apresentaram diferenças significativas. De acordo com os resultados, a referida capacidade também não interfere com a capacidade para as bactérias aderirem a células do epitélio mamário em cultura.

As estirpes de *Staph. epidermidis* causadoras de mastite ovina exibiram capacidade para aderir a células epiteliais de glândula mamária *in vitro*. Porém, a maior ou menor aptidão revelada pelos diferentes isolados não influenciou a

reação produzida na glândula mamária, de acordo com os resultados observados no TCM.

Não foi possível, no presente estudo, identificar estirpes de *Staph. epidermidis* causadoras de mastite ovina que sejam produtoras de superantígenos.

Foram identificadas proteínas de *Staph. epidermidis* responsáveis por mastite, que são reconhecidas por imunoglobulinas presentes no sangue e no leite de ovelhas. Porém, as proteínas com pesos moleculares 35-37 kDa, que só foram reconhecidas, de uma forma insistente, por anticorpos existentes no leite e não no sangue, poderão eventualmente ser consideradas como antígenos vacinais se os anticorpos por si induzidos forem efectivamente protectores.

Quanto à resposta imunológica humoral resultante da infecção da glândula mamária ovina por *Staph. epidermidis*, não se verificou haver reação sistémica em animais com mastite, comparativamente a animais saudáveis. Porém, a resposta humoral local foi evidente, tendo-se verificado em animais infectados a presença de IgA capaz de reconhecer mais epitopos do que os reconhecidos por IgA de animais não infectados. Além disso, apenas se registou a presença de IgG específica para proteínas de *Staph. epidermidis* nas secreções mamárias de animais infectados.

Apesar de, no leite de ovelha, a IgG ser a imunoglobulina existente em maior quantidade, os resultados obtidos não permitiram verificar a presença de IgG específica para *Staph. epidermidis* em animais livres de infecção intramamária.

Nos ruminantes, a substituição da IgA, como imunoglobulina predominante, por IgG é, provavelmente, resultante de uma adaptação evolutiva à privação da passagem de anticorpos para o feto, através da placenta (Kehrli e Harp, 2001). A função principal da IgG no leite é, portanto, a protecção da cria através da imunidade materna, transmitida passivamente da mãe ao recém-nascido através do leite e não a protecção da glândula mamária. Segundo Berthon e Salmon (1993), os anticorpos presentes nas secreções mamárias possuem uma especificidade dominante para os antígenos e microrganismos presentes no tracto digestivo da mãe e Chang e colaboradores (1981) sugerem que são segregados principalmente por plasmócitos de origem intestinal.

A presença de IgG específica para as proteínas estafilocócicas no sangue e não no leite, das ovelhas saudáveis, poderá dever-se ao facto de o sistema de *homing* selectivo para os tecidos não reconhecer a probabilidade de aqueles antigénios aparecerem na glândula mamária, visto que este local é estéril. Porém, existe IgA específica nos mesmos animais. Os resultados obtidos neste trabalho, confrontados com diversos factos referidos na bibliografia consultada, sugerem-nos um modelo explicativo que apresentamos (Fig. 9).

No soro sanguíneo das vacas e das ovelhas, a IgG1 corresponde a cerca de 47% das imunoglobulinas presentes e a IgG2 representa cerca de 37%. Portanto, existem em quantidades relativamente equivalentes. Contudo, no leite, a IgG1 representa perto de 75% e a IgG2 equivale a mais ou menos 5% (Butler, 1998). Durante um processo inflamatório a IgG2 é transportada para o leite pelos neutrófilos (Sordillo *et al.*, 1997), os quais possuem receptores específicos que se ligam unicamente à fracção FC das IgG2 (Tizard, 2004). Por outro lado, após um estímulo inflamatório, apesar de aumentar a passagem passiva de proteínas séricas para o leite, o transporte activo de IgG1 é inibido (Lascelles, 1979) e, na glândula totalmente involuída, não há transporte activo de IgG1 (Colditz e Watson, 1985). Estes factos sugerem-nos que a IgG1 que existe no sangue não é importante para fazer face à infecção na glândula mamária e que a sua função será outra, enquanto a IgG2 é, provavelmente, fundamental para combater os agentes invasores.

Vários autores referem, relativamente a agentes etiológicos de mastite, que a capacidade de IgG2 para opsonizar antigénios é muito superior à apresentada por IgG1 (Caffin e Poutrel, 1988; Watson, 1989; Sutra e Poutrel, 1994). Rainard e Poutrel (1993) referem que no sangue dos ruminantes adultos há opsoninas dirigidas contra quase todas as bactérias causadoras de mastite. No entanto, o leite da glândula mamária sã tem uma fraca actividade opsonizante, que aumenta durante a reacção inflamatória. A infusão local da glândula mamária de ovino também induz um aumento do poder opsonizante do leite.

O facto de, neste estudo, os animais saudáveis apresentarem apenas no soro sanguíneo, e não no leite, IgG específica para proteínas de *Staph. epidermidis*, sabendo que a IgG, principalmente a IgG1, é a imunoglobulina que existe em

maior quantidade no leite de ovelha, sugere-nos a hipótese de a fracção de IgG do sangue, que apresenta especificidade para os antígenos estafilocócicos, ser IgG2. Neste trabalho, porém, não fizemos a detecção individualizada de cada subclasse de IgG.

De acordo com a hipótese que sugerimos, a dinâmica da IgG entre o sangue e a glândula mamária poderia ser explicada do seguinte modo (Fig. 9).

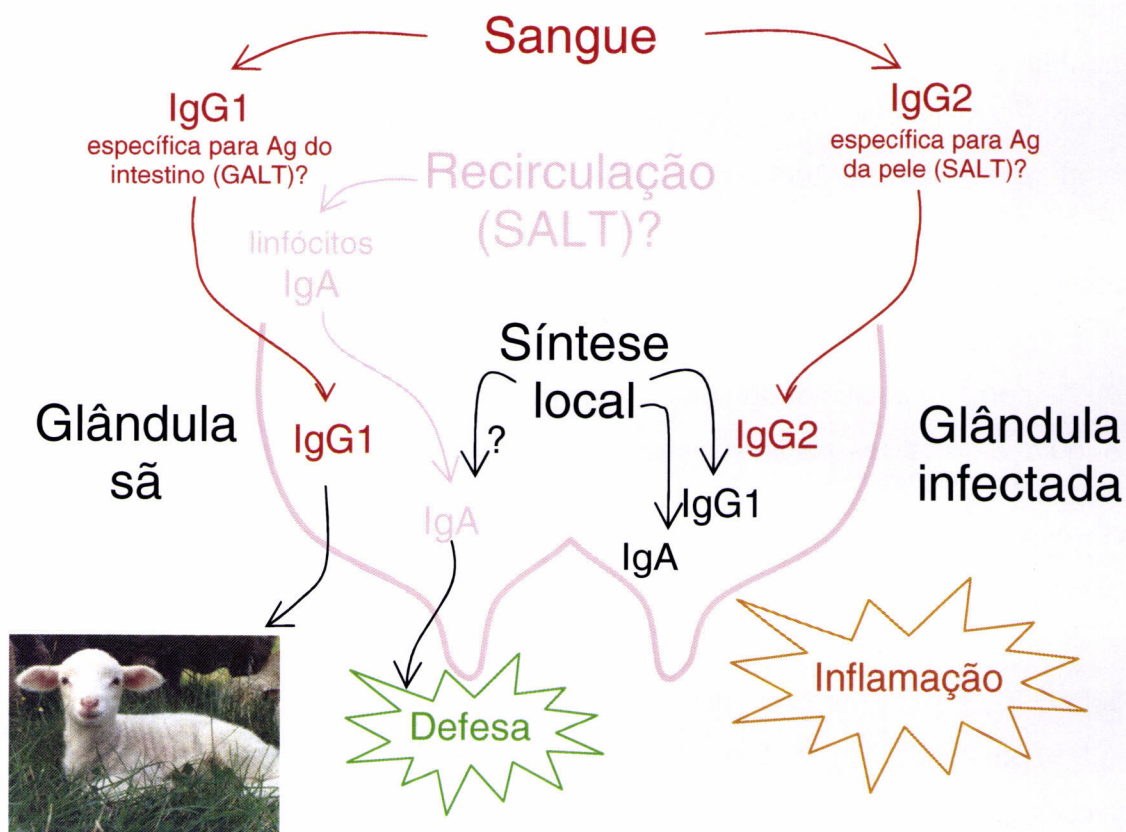


Figura 9: Modelo proposto para explicar a dinâmica de imunoglobulinas na glândula mamária ovina

No sangue, a IgG1 tem especificidade sobretudo para antígenos intestinais e, ao ser transportada para a glândula mamária, tem como principal função a protecção do recém-nascido ruminante, o qual possui receptores específicos nos enterócitos que permitem o transporte activo da IgG1 e não da IgG2 (Berthon e Salmon,

1993). Assim se justifica que a IgG1 sérica seja transportada activamente para a glândula mamária em grandes quantidades, principalmente durante a produção de colostro. A IgG2 com especificidade para as proteínas de *Staph. epidermidis* é transportada, ligada aos neutrófilos, apenas durante a inflamação, altura em que ocorre uma leucodiapedese acentuada e a acumulação de neutrófilos na glândula mamária.

A explicação para a diferença de especificidade entre as duas subclasses de IgG, no sangue, poderá advir do facto de os plasmócitos que produzem cada um dos isotipos provirem de diferentes locais. Actualmente acredita-se que o sistema de imunidade local da glândula mamária nos ruminantes pertence ao sistema imunológico da pele (SALT) e não ao sistema imunológico do intestino (GALT), como acontece nos monogástricos (Kehrli e Harp, 2001). Assim, a IgG1 no sangue pode ser produzida, essencialmente, por plasmócitos provenientes de linfócitos B estimulados nas placas de Peyer e, portanto, com especificidade para os antigénios do intestino, sendo a IgG2 segregada por células procedentes do SALT com especificidade para antigénios da pele, onde os estafilococos coagulase negativos predominam.

A produção pelos plasmócitos de uma ou outra classe, ou subclasse, de imunoglobulinas depende das citoquinas, produzidas por linfócitos T *helper*, que activam promotores específicos na célula B, os quais dirigem o enzima recombinase para uma ou outra posição, de forma a induzir a mudança de classe de IgM para IgG1, ou IgG2 ou IgA, *etc* (Tizard, 2004). A mudança de classe (*class switching*) dá-se geralmente nos centros germinativos dos órgãos linfáticos secundários, onde se produzem as células de memória, portanto, a maior parte dos linfócitos B, quando são libertados destes centros germinativos para a corrente linfática, já estão cometidos a produzir determinado isotipo (Ahmed e Gray, 1996). A produção de diferentes citoquinas nas placas de Peyer do intestino e nos linfonodos periféricos poderá justificar a razão para se produzirem diferentes células efectoras, células produtoras de IgG1 de origem intestinal e células produtoras de IgG2 com origem na pele.

A hipótese apresentada poderá explicar a ausência de IgG, específica para os antigénios associados a mastite, no leite de ovelhas saudáveis. Após infecção

intramamária, além do afluxo de IgG2 específica proveniente do sangue, haverá produção local, principalmente, de IgA e de IgG1 específicas para combater os agentes invasores. Após imunização local na glândula mamária bovina, verificou-se a produção local de IgG1 e de IgA, visto que o aumento destas imunoglobulinas foi superior nas glândulas inoculadas em relação às glândulas não inoculadas, e foi detectada a presença de quantidades apreciáveis de linfócitos B produtores destes dois isotipos nos tecidos mamários, embora também tenham sido observadas células produtoras de IgG2 e IgM (Chang *et al.*, 1981).

Vários autores referem que a imunização intramamária produz uma resposta mais protectora do que a vacinação utilizando outras vias de inoculação dos antigénios (Chang *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1999). Os resultados deste trabalho indicam que só através de uma vacinação local se poderá obter uma população de células produtoras de IgG na glândula mamária, o que provavelmente permitirá uma resposta mais rápida após invasão por agentes de mastite.

Estes resultados sugerem, também, um papel fundamental da IgA na defesa da glândula mamária ovina (Fig. 9), visto que é a imunoglobulina, presente no leite de ovelhas saudáveis, que manifesta especificidade para o principal agente etiológico de mastite nesta espécie. A exclusão imunitária, de agentes patogénicos na glândula mamária, pode eventualmente ser potenciada se for aumentada a quantidade de IgA na glândula mamária.

Os estudos sobre estimulação imunológica da glândula mamária em ruminantes têm-se direccionado para a produção de IgG2 e IFN- γ , tendo como objectivo aumentar a opsonização, melhorando a fagocitose. Os resultados obtidos no presente trabalho levam-nos a propor uma forma de estimulação direccionada para o aumento da IgA. Trabalhos recentes de Leitner (2005), efectuados em bovinos, indicam que só é possível obter IgA específica na glândula mamária através da imunização local. O autor sugere que as células de memória são bloqueadas na glândula estimulada, não atingindo a corrente sanguínea nem a(s) glândula(s) não estimuladas. De acordo com esta hipótese, apenas através da imunização local será possível ampliar a resposta de IgA na glândula mamária.

Além da imunização local, parece-nos interessante sugerir a utilização da via intradérmica ou aplicação dos antígenos por escarificação, para vacinação dos animais. Com efeito, partindo do princípio, actualmente aceite, de que as imunoglobulinas com especificidade para os antígenos importantes na glândula mamária provêm de linfócitos B pertencentes ao SALT, esta estratégia poderá aumentar o nível de IgG2 específica no sangue e/ou de IgA específica na glândula mamária, se a hipótese de Leitner (2005) não se aplicar a ovinos.

6.2 – PERSPECTIVAS

As conclusões retiradas do trabalho que apresentamos revelaram-nos a urgência de assumir um papel proactivo no controlo de mastites em ovelhas e sugerem-nos linhas de investigação que nos parecem relevantes para evoluir no conhecimento dos mecanismos de infecção dos agentes etiológicos e dos mecanismos de defesa da glândula mamária.

Os resultados da nossa investigação devem beneficiar o sector alvo deste estudo, através da disseminação de conclusões, da formação de produtores de leite de ovelha e de apoio consultivo e laboratorial. Alguns aspectos claramente identificados ao longo deste trabalho deverão ser debatidos e corrigidos para se atingir um nível sanitário elevado das glândulas mamárias e, conseqüentemente, melhorar a produção e a qualidade do leite produzido.

Assim, poderá ser desenvolvido um trabalho de apoio a produtores de leite, consistindo em acções de formação em que serão aconselhadas medidas de prevenção de mastites, designadamente [1] verificação frequente do funcionamento e manutenção do equipamento de ordenha, [2] utilização regular do TCM para controlo contínuo do estado sanitário das glândulas mamárias dos animais, advertindo sobre o facto de um TCM positivo implicar baixa produção e má qualidade do leite e aconselhar a utilização de um ponto *cut off* baixo, [3] implementação de medidas de higiene na ordenha e utilização do tratamento de secagem. É necessário, também, informar os produtores sobre o prejuízo para os consumidores inerente ao uso não prudente dos agentes antimicrobianos e do impacto negativo que alguns microrganismos causadores de MSC têm sobre a saúde pública, devido ao seu poder patogénico para o consumidor ou à possibilidade de disseminar genes de resistência a antibióticos.

Quanto aos trabalhos de investigação que julgamos ser a sequência lógica dos estudos realizados, propomo-nos [1] estender o estudo para avaliação da capacidade para produzir biofilme em *Staphylococcus epidermidis* ao estudo genético dos isolados já avaliados, [2] avaliar a capacidade de *Staph. epidermidis*

para invadir células do epitélio mamário, através de estudos *in vitro* com alterações ao protocolo utilizado neste trabalho, nomeadamente tempo de incubação mais prolongado e aplicação de substâncias alternativas à lisostafina para lisar as bactérias aderentes às células, [3] identificar moléculas de adesão a células epiteliais em *Staph. epidermidis*, segundo o método “*ligand-binding assay*”, descrito por Vilela (1993), com o objectivo de avaliar a utilização de adesinas como antigénios vacinais, cujos anticorpos específicos poderão actuar contrariando a colonização (IgA) e potenciando a fagocitose através da opsonização (IgG), [4] estudar comparativamente as respostas imunológicas correspondentes a diferentes vias de inoculação de antigénios, com especial interesse na via intradérmica, através de ensaios *in vivo*, e averiguar a eficiência imunogénica das proteínas identificadas neste trabalho, tal como a eficácia protectora dos respectivos anticorpos, [5] investigar a reacção imunológica humoral, local e sistémica, à infecção experimental da glândula mamária com *Staph. epidermidis*, com o objectivo de esclarecer o modelo proposto para explicar a dinâmica de imunoglobulinas na glândula mamária.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, B.; Amorena, B. e Iturralde, M. (2001). Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. Vet. Microbiol., 78: 183-191.
- AHMAD, G.; Times, L.L.; Morrical, D.G. e Brackelsberg, P.O. (1992a). Dynamics and significance of ovine subclinical intramammary infections and their effects on lamb performance. Sheep Res. J., 8 (1): 25-29.
- AHMAD, G.; Timms, L.L.; Morrical, D.G. e Brackelsberg, P.O. (1992b). Ovine subclinical mastitis: efficacy of dry treatment as a therapeutic and prophylactic measure. Sheep. Res. J., 8 (1): 30-33.
- AHMED, R. e Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science, 272: 54-60.
- AÏSSA, N.; Stolar, D. e Legrand, P. (2004). Performance de quatre méthodes d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé et de l'automate Vitek 2TM pour la détection de la méticillino-resistance chez les staphylocoques à coagulase négative. Pathol. Biol., 52: 26-32.
- AKINEDEN, Ö.; Annemuller, C.; Hassan, A.A.; Lammler, C.; Wolter, W. e Zschock, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8 (5): 959-964.
- ALLIGNET, J.; Aubert, S.; Dyke, K.G.H. e Solh, N.E. (2001). *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. Infect. Immun., 69 (2): 712-718.
- ALMEIDA, R.A e Oliver, S.P. (1993). Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*. J. Vet. Med. (series B), 40:707-714.
- ALMEIDA, R.A. e Oliver, S.P. (1995). Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. J. Dairy Sci., 78: 1310-1317.
- ALMEIDA, R.A.; Matthews, K.R.; Cifrian, E.; Guidry, A.J. e Oliver, S.P. (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J. Dairy Sci., 79: 1021-1026.
- ALMEIDA, R.A e Oliver, S.P. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog., 31: 205-212.

- ALMEIDA, R.A e Oliver, S.P. (2005). Binding of host factors influences intracellular trafficking and survival of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 771.
- ALMEIDA, R.; Batcha, T e Oliver, S. (2005). Persistence of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 137- 142.
- ALSENOSY, A.M. e Dennis, S.M. (1985). Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis* mastitis in ewes. Aust. Vet. J., 62 (7): 234-237.
- AMORENA, B.; Baselga, R. e Albizu, I. (1994). Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine, 12 (3): 243 – 249.
- ANAYA-LÓPEZ, J.L.; Contreras-Guzmán, O.E.; Cárabez-Trejo, A.; Baizabal-Aguirre, V.M.; López-Meza, J.E.; Valdez-Alarcón, J.J. e Ochoa-Zarzoza, A. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res. Vet. Sci., *in press*.
- ANDERSON, J.C. (1978). Absence of bacterial adherence in the establishment of experimental mastitis in mice. Vet. Pathol., 15: 770-775.
- ANDERSSON, R.; Leon, L.; Rapp, C.; Socha, M.T. e Tomlinson, D.J. (2005). The effect of complexed zinc on milk somatic cell count and lactate dehydrogenase activity in dairy cows. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 966.
- ANGEN, Ø.; Mutters, R.; Caugant, D.A.; Olsen, J.E. e Bisgaard, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 67-86.
- ANGEN, Ø.; Ahrens, P.; Kuhnert, P.; Christensen, H. e Mutters, R. (2003). Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for three species *incertae sedis* '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1449-1456.
- ANGULO, F.J.; Nargund, V.N. e Chiller, T.C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. J. Vet. Med., 51: 374-379.

- APARICIO, N.; Paniagua, J.P.; Baselga, R. e Albizu, I. (2005). Comenzar un programa de control de la mastitis ovina y caprina. www.exopol.com/general/circulares/54circ.html. Consultado em Janeiro, 2006.
- APOLO, A.; Bellizzi, T.; Lima, D. e Burgueno, M. (1999). Subclinical mastitis in dairy sheep in Uruguay. Milking and milk production of dairy sheep and goats. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 168-170.
- ARCHER, G.L.; Niemeyer, D.M.; Thanassi, J.A. e Pucci, M.J. (1994). Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 447-454.
- ARIZNABARRETA, A.; Gonzalo, C. e San Primitivo, F. (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. J. Dairy Sci., 85 (6): 1370-1375.
- BABIUK, L.A.; Sordillo, L.M.; Campos, M.; Hughes, H.P.A.; Rossi-Campos, A. e Harland, R (1991). Application of interferons in the control of infectious diseases of cattle. J. Dairy Sci., 74 (12): 4385-4398.
- BAIN, I.; Salgado, E. e Iglesias, R. (2003). Comparación entre el Californian mastitis test y el recuento de células somáticas en leche de oveja. 26° Congreso Argentino de Producción Animal, Mendoza, Argentina.
- BALDASSARRI, L.; Donelli, G.; Gelosia, A.; Simpson, A.W. e Christensen, G.D. (1997). Expression of slime interferes with *in vitro* detection of host protein receptors of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun., 65 (4): 1522-1526.
- BANNERMAN, D.D.; Paape, M.J.; Lee, J.W.; Zhao, X.; Hope, J.C. e Rainard, P. (2004). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. Clin. Diagn. Lab Immunol., 11 (3): 463-472.
- BANNERMAN, D.D.; Chockalingam, A. e Paape, M.J. (2005). The bovine innate immune response to intramammary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 744.
- BARBER, M.R.; Pantschenko, A.G.; Hinckley, L.S. e Yang, T.J. (1999). Inducible and constitutive *in vitro* neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells. Clin. Diagn. Lab Immunol., 6 (6): 791-798.
- BARBERIO, A.; Fontana, D.; Marsilio, E. e Dalvit, P. (2005). Coagulase-negative *Staphylococci* infection in dairy cows. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 865-866.

- BARRIO, B.; Vangroenweghe, F.; Dosogne, H. e Burvenich, C. (2000). Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime producing *Staphylococcus aureus* strain. Vet. Res., 31: 603-609.
- BARRIO, M.B.; Rainard, P.; Gilbert, F.B. e Poutrel, B. (2003). Assessment of opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with *Staphylococcus aureus*. J. dairy Sci., 86: 2884-2894.
- BASELGA, R.; Albizu, I.; De La Cruz, M.; Cacho, E.D.; Barberan, M. e Amorena, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. Infect. Immun. 61 (11): 4857-4862.
- BASELGA, R.; Albizu, I. e Amorena, B. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis: A review. Vet. Microbiol., 39: 195-204.
- BAUTISTA, L.; Gaya, P.; Madina, M. e Nuñez, M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *Staphylococci*. Appl. Environ. Microbiol., 54 (2): 566-569.
- BAYLES, K.W.; Wesson, C.A.; Liou, L.E.; Fox, L.K.; Bohach, G.A. e Trumble, W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect. Immun., 66 (1): 336-342.
- BEDIDI-MADANI, N.; Greenland, T. e Richard, Y. (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. Vet. Microbiol., 59: 139-145.
- BELKUM, A.V.; Kools-Sijmons, M. e Verbrugh, H. (2002). Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. J. Microbiol. Methods, 48: 19-42.
- BENGTSSON, B.; Unnerstad, H.; Ekman, T.; Waller, K.P.; Lindberg, A.; Artursson, K.; Jovanovic, J. e Öst, M.N. (2005). Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria causing acute clinical mastitis in dairy cows in Sweden 2002-03. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 888-889.
- BERGONIER, D.; Berthelot, X.; Romeo, M.; Contreras, A.; Coni, V.; De Santis, E.; Rolesu, S.; Barillet, F.; Lagriffoul, G. e Marco, J. (1999). Fréquence des différents germes responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les petits ruminants laitaires. Milking and milk production of dairy sheep and goats. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 130-136.
- BERGONIER, D.; Lagriffoul, G.; Barillet, F.; Rupp, R.; Valognes, A.; Brugidouux, R. ; Duquesnel, R. e Berthelot, X. (2005a). Aetiological, clinical and epidemiological characterization of

- clinical mastitis in dairy sheep. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 497-503.
- BERGONIER, D.; Lagriffoul, G.; Concordet, D.; Barillet, F. e Berthelot, X. (2005b). Subclinical mastitis in dairy sheep: Aetiology and diagnosis using somatic cell counts. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 921-922.
- BERRIATUA, E.; Ziluaga, I.; Miguel-Virto, C.; Uribarren, P.; Juste, R.; Laevens, S.; Vandamme, P. e Govan, J.R.W. (2001). Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. J. Clin. Microbiol., 39 (3): 990-994.
- BERTHELOT, X.; Lagriffoul, G.; Concordet, D.; Barillet, F. e Bergonier, D (2006). Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. Small Rumin. Res., 62 : 27-31.
- BERTHON, P. e Salmon, H. (1993). Facteurs immunitaires des sécrétions mammaires. De "Biologie de la lactation". Eds: J. Martinet e L.M. Houdebine, Editions INSERM/INRA, França. ISBN INSERM: 2-85598-522-6 ; ISBN INRA: 2-7380-0427-X. Pp: 389-414.
- BEXIGA, R.; Cavaco, L. e Vilela, C.L. (2003). Antimicrobial therapy: The issue of a "second choice" for bovine mastitis. MICRO'2003 - Proceedings of the National Congress of Microbiology, 29-11 a 2-12, Tomar, Portugal.
- BEXIGA, R.; Nunes, S.F.; Cavaco, L.M. e Vilela, C.L. (2005a). Padrões de resistência a antibióticos de *Staphylococci* isolados de mastites subclínicas bovinas. Livro de Resumos do Congresso de Ciências Veterinárias 2005, Santarém, Portugal: p. 111.
- BEXIGA, R.; Cavaco, L.M. e Vilela, C.L. (2005b). Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. Rev. Port. Cienc. Vet., 100 (553-554): 39-44 .
- BIO, C.; Bertollo, F. e Bio, R. (2005). The subclinical mastitis in sheep duly slaughtered and milk quality. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 919.
- BOLZONI, G.; Varisco, G.; Bertocchi, L.; Cornoldi, M.; Posante, A. e Bravo, R. (2005). Microorganism isolation prevalence in bovine milk samples of the province of Brescia and *in vitro* antibiotic sensitivity. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 877-878.
- BOR, A.; Winkler, M. e Gootwine, e (1989). Non-clinical intramammary infection in lactating ewes and its association with clinical mastitis. Br. Vet. J., 145 (2): 178-184.
- BOUCHOT, M.C.; Catel, J.; Chirol, C.; Ganiere, J.P. e Le Menec, M. (1985). l'antibiogramme et le traitement des infection mammaire des bovins. Rec. Méd. Vet., 161 (6-7): 587-601.

- BOUTET, P. e Lekeux, P. (2005). A comparison of somatic cell count and antimicrobial susceptibility of subclinical mastitis pathogens in organic and conventional dairy herds. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 769.
- BRENNER, D.J. (1984). Family I. Enterobacteriaceae. Rhan, 1937, Nom. fam. cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958, 73; Ewing, farmer and Brenner 1980, 674; Judicial Commission 1981, 104. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 408-516.
- BRINKMANN, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y. e Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 303: 1532-1535.
- BROADBENT, J.R.; Chou, Y.C.; Gillies, K. e Kondo, J.K. (1989). Nisin inhibits several Gram-positive, mastitis causing pathogens. J. Dairy Sci., 72 (12): 3342 – 3345.
- BROUILLETTE, E.; Grondin, G.; Shkreta, L.; Lacasse, P. e talbot, B.G. (2003). In vivo and in vitro demonstration that Staphylococcus aureus is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. Microb. Pathog., 35: 159-168.
- BURGESS, R.J. (1991). Golden udder. A non-antibiotic treatment for mastitis. Sheep Dairy News, 8 (1): 57-58.
- BURNETTE-CURLEY, D.; Wells, V.; Viscount, H.; Munro, C.L.; Fenno, J.C.; Fives-Taylor, P. e Macrina, L. (1995). FimA, a major virulence factor associated with Streptococcus parasanguis endocarditis. Infect. Immun., 63 (12): 4669-4674.
- BURRIEL, A.R. (1997). Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative Staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. Vet. Record, 19: 419-423.
- BURTON, J.L. e Erskine, R.J. (2003). Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. Vet. Clin. Food Anim., 19: 1-45.
- BUSWELL, J.F. e Barber, M.L. (1989). Antibiotic Persistence and tolerance in the lactating sheep following a course of intramammary therapy. Br. Vet. J., 145: 552-557.
- BUTCHER, E.C. e Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. Science, 272: 60-66.
- BUTLER, J.E. (1998). Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. Rev. Sci. Tecch. Int. Epiz., 17 (1): 43-70.

- CAFFIN, J.P.; Poutrel, B. e Rainard, P. (1983). Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G1 concentration in milk. J. Dairy Sci., 66 (10): 2161-2166.
- CAFFIN, J.P. e Poutrel, B. (1988). Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. J. Dairy Sci., 71 (8): 2035-2043.
- CALHOUN, D.A.; Lunøe, M.; Du, Y. e Christensen, R.D. (2000). Granulocyte colony-stimulating factor is present in human milk and its receptor is present in human fetal intestine. Pediatrics, 105: 7-12.
- CALVINHO, L.F.; Almeida, R.A e Oliver, S.P. (1998). Potencial virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. Vet Microbiol., 61: 93-110.
- CAMPOS, M.; Godson, D.; Hughes, H.; Babiuk, L. e Sordillo, L. (1993). The role of biological response modifiers in disease control. J.Dairy Sci., 76 (8): 2407-2417.
- CAPUCO, A.V.; Bright, S.A.; Pankey, J.W.; Wood, D.L.; Miller, R.H. e Bitman, J. (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. J. Dairy Sci., 75: 2126-2130.
- CARRYN, S.; Chanteaux, H.; Seral, C.; Mingeot-Leclercq, M.P.; Van Bambeke, F. e Tulkens, P.M. (2003). Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. Infect. Dis. Clin. N. Am., 17: 615-634.
- CARTER, G.R. (1984). Genus I. *Pasteurella*. Trevisan, 1887, 94^{AL}. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 552-558.
- CARTER, G.R. e Cole, J.R. Jr (1990). Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5^a Ed., Academic Press, Inc. ISBN: 0-12-161775-0.
- CASADEVALL, A. e Pirofski, L.-A. (1999). Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect. Immun., 67 (8): 3703-3713.
- CASTAGLIUOLO, I.; Piccinini, R.; Beggio, E.; Ditadi, F.; Brun, P.; Robbi, C.; Vicenzoni, G. e Zecconi, A. (2005). Efficacy of a recombinant DNA vaccine against *Staph. aureus* in preventing adhesion to mammary gland epithelial cells. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 800.
- CATO, E.P.; George, W.L. e Finegold, S.M. (1986). Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1141-1200.

- CHAIYOTWITTAYAKUN, A.; Erskine, R.J.; Bartlett, P.C.; Herdt, T.H.; Sears, P.M. e Harmon, R.J. (2002). The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. J.Dairy Sci., 85 (1): 60-67.
- CHANG, C.C.; Winter, A.J. e Norcross, N.L. (1981). Immune response in the bovine mammary gland after intestinal, local and systemic immunization. Infect. Immun., 31 (2): 650-659.
- CHRISTENSEN, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M. and Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol., 22: 996-1006.
- CIFRIAN, E.; Guidry, A.J.; O'Brien, C.N.; Nickerson, S.C. e Marquardt, W.W. (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. J. Dairy Sci., 77: 970-983.
- CIFRIAN, E.; Guidry, A.J.; Bramley, A.J.; Norcross, N.L.; Bastida-Corcuera, F.D e Marquardt, W.W. (1996). Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol., 48: 187-198.
- CLAUS, D. e Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1105-1139.
- CLSI (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute publication M100-S16, Vol. 26, n° 3. ISBN: 1-56238-588-7.
- COLDITZ, I.G e Watson, D.L. (1985). The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. Aust. Vet J., 62 (5): 145-153.
- COLLINS, M.D. e Cummins, C.S. (1986a). Genus *Arcanobacterium* Collins, Jones e Schofield 1983, 438^{VP}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1287-1288.
- COLLINS, M.D. e Cummins, C.S. (1986b). Genus *Corynebacterium* Lehmann e Neumann 1896, 350^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1266-1283.

- Comunidades Europeias (2005). Do campo à mesa. Uma alimentação segura para os consumidores europeus. Série: A Europa em movimento. Luxemburgo: Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias.
- CONI, V.; Alongi, C.; Zintu, L.; Ligios, C.; Liciardi, M. e Pulina, G. (1999). Experimental intramammary infection with *Staphylococcus haemolyticus* in dairy ewes. Proceedings of the 6th International Symposium on the milking of small ruminants, Athens, Greece: 135-137.
- CONSTABLE, P.D. e Morin, D.E. (2003). Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. Vet. Clin. Food Anim., 19: 139-155.
- COSTA, J.A. e Melo, A.S. (1999). Dicionário da Língua Portuguesa. 8ª Edição. Porto Editora. ISBN: 972-0-05001-2.
- COSTA, P.M. (2005). Antibiorresistências na flora entérica (*Enterococcus spp.* e *Escherichia coli*) de frangos e humanos. Livro de Resumos do Congresso de Ciências Veterinárias 2005, Santarém, Portugal: p. 66.
- COSTERTON, J.W. e Irvin, R.T. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol., 35:299-324.
- COYLE, P.A.; Furda, G.; Tao, W.; Daley, M.J. e Johnston, P. (1992). R-Boll-1 β as a preventative and therapeutic for *S. aureus* mastitis: correlation with its effects upon polymorphonuclear neutrophil function. J. Dairy Sci., 75 Supplement 1: 145.
- CRAMTON, S.E.; Gerke, C.; Schnell, N.F.; Nichols, W.W. e Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun., 67 (10): 5427-5433.
- CRISPIE, F.; Flynn, J.; Hill, C.; Meaney, W.J. e Ross, R.P. (2005a). Application of a live *Lactobacillus lactis* culture as a novel treatment of mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 809-810.
- CRISPIE, F.; O'Loughlin, C.; Flynn, J.; Hill, C.; Ross, R.P.; Arkins, S. e Meaney, W.J. (2005b). Ability of the probiotic bacterium *Lactobacillus lactis* to act as an immunostimulant in the bovine mammary gland. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 811.
- CUCARELLA, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasa, Í. e Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bact., 183 (9): 2888-2896.

- CUCARELLA, C.; Tormo, M.A.; Knecht, E.; Amorena, B.; Lasa, Í.; Foster, T.J. e Penadés, J.R. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. Infect. Immun., 70 (6): 3180-3186.
- CUCARELLA, C.; Tormo, M.A.; Úbeda, C.; Trotonda, M.P.; Monzón, M.; Peris, C.; Amorena, B.; Lasa, Í.; Foster, T.J. e Penadés, J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., 72 (4): 2177-2185.
- CUCCURU, C. ; Manunta, L.; Grünberger, L.; Pilo, V.; Preti, C.; Moroni, P. e Zecconi, A. (1999). Dry sheep therapy: Effect of two systemic antibiotics against intramammary coagulase negative staphylococci infections and somatic cell counts at lambing. Proceedings of the 7th Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Santarém, Portugal: 333-335.
- DALEY, M.J.; Coyle, P.A.; Williams, T.J.; Furda, G.; Dougherty, R.; e Hayes, P.W. (1991). *Staphylococcus aureus* mastitis: Pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 β and interleukin-2. J.Dairy Sci., 74 (12): 4413-4424.
- DALEY, M.J.; Furda, G.; Dougherty, R.; Coyle, P.A.; Williams, T.J. e Johnston, P. (1992). Potential of antibiotic therapy for bovine mastitis by recombinant bovine interleukin-2. J. Dairy Sci., 75 (12): 3330-3338.
- DANIEL, L.R.; Chew, B.P.; Tanaka, T.S. e Tjoelker, L.W. (1991). β -Carotene and vitamin A effects on bovine phagocyte function in vitro during the peripartum period. J. Dairy Sci., 74 (1): 124-131.
- DARIO, C.; Laudadio, V.; Corsalini, T.; Bufano, G. e Buonavoglia, C. (1993). Subclinical mastitis in sheep: Occurrence, milk production and ethiology. World Conference on Animal Production, Edmond, Canada. Abst. 316.
- DARIO, C.; Laudadio, V.; Corsalini, T.; Bufano, G. e Buonavoglia, C. (1996).). Subclinical mastitis in sheep: Occurrence, ethiology and milk production in different genetic types. Agricultura Mediterranea, 126: 320-325.
- DAVIES, J. (1992). Another look at antibiotic resistance. J. General Microbiol., 138: 1553-1559.
- De BUYSER, M.L.; Dufour, B.; Marie, M. e Lafarge,, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Int. J. Food Microbiol., 67: 1-17.
- De La CRUZ, M. de la; Serrano, E.; Montoro, V.; Marco, J.; Romeo, M.; Baselga, R.; Albizu, I. e Amorena, A. (1994). Ethiology and prevalence of subclinical mastitis in the manchega sheep at mid-late lactation. Small Rumin. Res., 14: 175-180.

- De SANTIS, E.; Mureddu, A.; Mazzette, R.; Scarano, C. e Bes, M. (2005a). Detection of enterotoxins and virulence genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from sheep with subclinical mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 504-510.
- De SANTIS, E.; Caria, A.; Nieddu, M.P.; Viridis, S.; Mazzette, R.; e Cosseddu, A.M. (2005b). A pilot program to reduce the somatic cell count in bulk sheep milk. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 923.
- DEVRIESE, L.A. (1979). Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cows' udders. Res. Vet. Sci., 27: 313-320.
- DEVRIESE, L.A.; Hommez, J. ; Laevens, H. ; Pot, B. ; Vandamme, P. e Haesebrouck, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolysing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet. Microbiol., 70 (1-2): 87-94.
- DIFCO (1978). El Antibiograma: Sus Tecnicas y el Sistema Dispens-O-Disc. Information Tecnica.
- DINGES, M.M.; Orwin, P.M., e Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev., 13: 16-34.
- DOGAN, B.; Klaessig, S.; Simpson, K.; Oliver, S.; Almeida, R. e Schukken, Y.H. (2005). Pathogenesis of chronic intramammary *Escherichia coli* infections. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 131-136.
- DONOVAN, D.M.; Dong, S.; Garrett, W.; Rousseau, G.M.; Moineau, S. e Pritchard, D.G. (2006). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. Pppl. Environ. Microbiol., 72 (4): 2988-2996.
- DONOWITZ, G.R. (1994). Tissue-directed antibiotics and intracellular parasites: complex interaction of phagocytes, pathogens and drugs. Clin. Infect. Dis., 19 (5): 926-930.
- DOPFER, D.; Almeida, R.A; Lam, T.J.G.M.; Nederbragt, H.; Oliver, S.P. e Gaastra, W. (2000). Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. Vet. Microbiol., 74: 331-343.
- DOPFER, D.; Nederbragt, H.; Almeida, R.A. e Gaastra, W. (2001). Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. Vet Microbiol., 80: 285-296.
- DUNNE, W.M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?. Clin. Microbiol. Rev., 15: 155-166.

- EBLING, T.L.; Fox, L.K.; Bayles, K.W.; Bohach, G.A.; Byrne, K.M.; Davis, W.C.; Ferens, W.A. e Hillers, J.K. (2001). Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene for staphylococcal enterotoxin C₁. J. Dairy Sci., 84: 2044-2050.
- ELIOPOULOS, G.M. e Moellering Jr., R.C. (1996). Antimicrobial combinations. De "Antibiotics in Laboratory Medicine" (4^a edição). Ed: Victor Lorian, Williams & Wilkins, USA. ISBN: 0-683-05169-5.
- EL-MASANNAT, E.T.S.; Jones, J.E.T. e Scott, M.J. (1991). The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. J. Comp. Path., 105: 455-465.
- ERSKINE, R.J.; Walker, R.D.; Bolin, C.A.; Bartlett, P.C. & White, D.G. (2002). Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci., 85: 1111-1118.
- EUZEBY, J.P. (2004). *Burkholderia*. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. <http://www.bacdico.net>. Consultado em Dezembro, 2005.
- EUZÉBY, J.P. (2005). *Enterococcus*. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. <http://www.bacdico.net>. Consultado em Dezembro, 2005.
- EVANS, J.B. (1986). Genus *Aerococcus* Williams, Hirsch e Cowan 1953, 475^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1080.
- FALADE, S.; Fagbore, G.O. e Ogunkeye, B.O. (1988). Bacteria associated with mastitis in sheep in Ibadan, Nigeria. Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr., 36: 275-277.
- FANG, W.H.; Shi, M.H.; Huang, L.Q.; Shao, Q.J.; Chen J. (1993). Growth of *Lactobacilli*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Normal and mastitic milk and whey. Vet. Microbiol., 37 (1/2): 115-125.
- FERNÁNDEZ, E.P.; Vela, A.I.; Las Heras, A.; Domínguez, L.; Fernández-Garayzábal, J.F. e Moreno, M.A. (2001). Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. International J. Antimicrob. Agents, 18:571-574.
- FERNÁNDEZ, E.; Blume, V.; Garrido, P.; Collins, M.D.; Mateos, A.; Domínguez, L. e Fernández-Garayzábal, J.F. (2004). *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* susp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 2291-2296.

- FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; Collins, M.D.; Huston, R.A.; Fernández, E. e Monasterio, R.; Marco, J. e Domínguez, L. (1997). *Corynebacterium mastitidis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. Int. J. Syst. Bacteriol., 47 (4): 1082-1085.
- FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; Collins, M.D.; Huston, R.A.; Gonzalez, I.; Fernández, E. e Domínguez, L. (1998a). *Corynebacterium camporealensis* sp. nov., associated with subclinical mastitis in sheep. . Int. J. Syst. Bacteriol., 48: 463-468.
- FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; Fernández, E.; Las Heras, A.; Pascual, C.; Collins, M.D. e Domínguez, L. (1998b). *Streptococcus parasanguinis*: New pathogen associated with asymptomatic mastitis in sheep. Emerg. Infect. Dis., 4 (4): 645-647.
- FIDELAK, C.; Reinecke, A.; Merck, C.C.; Klocke, P. e Spranger, J. (2005). New strategies to reduce antibiotics in therapy of bovine clinical mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 812.
- FIELD, T.R.; Ward, P.N.; Pedersen, L.H. e Leigh, J.A. (2003). The hyaluronic acid capsule of *Streptococcus uberis* is not required for the development of infection and clinical mastitis. Infect. Immun., 71: 132-139.
- FINLAY, B.B. e Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 61 (2): 136-169.
- FITZGERALD, J.R.; Hartigan, P.J.; Meaney, W.J. e Smyth, C.J. (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. J. Appl. Microbiol., 88: 1028-1037.
- FITZGERALD, J.R.; Monday, S.R.; Foster, T.J.; Bohach, G.A.; Hartigan, P.J.; Meaney, W.J. e Smyth, C.J. (2001). Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J. Bacteriol., 183: 63-70.
- FLOCK, J.I. (1999). Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. Mol. Med. Today, 5: 532-537.
- FONTAINE, M.C. e Smith, D.G.E. (2006). Microbial biofilms: Does breaking the microbes' community spirit hold the key to beating persistent mastitis? Vet. J., 171: 387-388.
- FREEMAN, D.J.; Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol., 42: 872-874.
- FTHENAKIS, G.C. e Jones, J.E.T. (1990a). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. Br. Vet. J., 146 (1): 43-49.

- FTHENAKIS, G.C. e Jones, J.E.T. (1990b). The effect of Coagulase-negative Staphylococci into the ovine mammary gland. J. Comp. Path., 102: 211-219.
- FTHENAKIS, G.C.; El-Masannat, E.T.S.; Booth, J.M. e JONES, J.E.T. (1991). Somatic cell counts of ewes' milk. Br. Vet. J., 147: 575-581.
- FTHENAKIS, G.C.; Marples, R.R.; Richardson, J.F. e Jones J.E.T. (1994). Some properties of coagulase-negative Staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. Epidemiology and Infection, 112: 171-176.
- FURDA, G.J.; Daley, M.J.; Hayes, P. e Johnston, P. (1992). Infusion of recombinant bovine interleukin-2 into infected mammary glands at dry off provides increased protection against S. aureus challenge during early involution. J. Dairy Sci., 75 Supplement 1: 145.
- FVE – Federation of Veterinarians of Europe (2005). Antibiotic Resistance & Prudent Use of Antibiotics in Veterinary Medicine.
http://www.fve.org/papers/pdf/vetmed/position_papers/antibioen.pdf. Consultado em Dezembro, 2005.
- GELLERT, M.; O'Dea, M.H.; Itoh, T. e Tomizawa, J.-I. (1976). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 (12): 4474 - 4478.
- GIESECKE, W.H.; du Preez, J.H. e Petzer, I.M. (1994). Practical mastitis control in dairy herds. Ed: Butterworth Publishers (Pty) Ltd. ISBN: 0 409 10923 1.
- GÓMEZ, M.I.; Sordelli, D.O.; Buzzola, F.R. e García, V.E. (2002). Induction of cell-mediated immunity to Staphylococcus aureus in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. Infect. Immun., 70 (8): 4254-4260.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B.E.; Gómez-Treviño, M. e Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de prebióticos. Revista Salud Pública y Nutrición, 4 (2).
<http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>. Consultado em Novembro, 2005.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.C.; Gonzalo, C.; San Primitivo, F. e Cármenes, P. (1995). Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. J.Dairy Sci., 78 (12): 2753-2759.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.C. e Cármenes, P. (1996). Evaluation of the California mastitis test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes. Small Rumin. Res., 21: 245-250.

- GONZALO, C.; Ariznabarreta, A.; Carriedo, J.A. e San Primitivo, F. (2002). Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. J. Dairy Sci., 85 (6): 1460-1467.
- GOODFELLOW, M. e Lechevalier, M.P. (1986). Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1459-1471.
- GÖTZ, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. Mol. Microbiol., 43 (6): 1367-1378.
- GRESHAM, H.D.; Lowrance, J.H.; Caver, T.E.; Wilson, B.S.; Cheung, A.L. e Lindberg, F.P. (2000). Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J. Immunol., 164: 3713 - 3722.
- GRIMONT, P.A.D. e Grimont, F. (1984). Genus VIII. *Serratia*. Bizio, 1823, 288^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 477-484.
- GRÖNLUND, U.; Johannisson, A. e Waller, K.P. (2005). Changes in lymphocyte sub-population during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 758.
- GUDDING, R.; McDonald, J.S. e Cheville, N.F. (1984). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic and ultrastructural pathologic findings. Am. J. Vet. Res., 45 (12): 2525-2531.
- GUTIERREZ, L.M.; Garcia Lopez, M.L.; Otero, A.; Garcia Fernandez, M.C. e Moreno, B. (1990). Incidence of Staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the stains. Milchwissenschaft, 45 (12): 778-781.
- GWYNNE, P. e Heebner, G. (2005). Advances in proteomics – preparing proteins. Science online, www.sciencemag.org/. Consultado em Maio de 2005.
- HACKER, J. e Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Mol. Microbiol., 3: 1089–1097.
- HÁJEK, V. e Maršálek, E. (1973). The occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in hosts of different animal species. Zbl. Bakt. Hyg., 223: 63-68.
- HÁJEK, V. (1978). Identification of enterotoxigenic *Staphylococci* from sheep and sheep cheese. Appl. Environ. Microbiol., 35: 264-268.

- HAMANN, J. e Stanitzke, U. (1990). Studies on pathogenesis of bovine mastitis by comparison of milking conditions as calf suckling, hand milking and machine milking: reactions of the teat tissue. *Milchwissenschaft*, 45 (10): 632-637.
- HAN, H.R. e Han, B. (2005). Chinese tradicional herbs therapy of mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 954.
- HAND, W.L. e King-Thompson, N.L. (1986). Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29 (1): 135-140.
- HARDIE, J.M. (1986). Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1043-1071.
- HARMON, R.J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 77 (7): 2103-2112.
- HARMON, R.J. e Torre, P.M. (1994). Copper and zinc: do they influence mastitis? Proceedings of the 33rd Annual Meeting National Mastitis Council, Orlando, USA: 54-65.
- HARMON, R.J.; Clark, T.W.; Trammell, D.S.; Smith, B.A.; Akers, K.; Torre, P.M.; Langlois, B.E e Hemken, R.W. (1994a). Copper status and mastitis in heifers with or without prepartum copper supplementatio. *J. Anim. Sci.*, 72, Suppl 1 / *J. Dairy Sci.*, 77, Suppl. 1: 198.
- HARMON, R.J.; Clark, T.W.; Trammell, D.S.; Smith, B.A.; Torre, P.M.; e Hemken, R.W. (1994b). Influence of copper status in heifers on response to intrammary challenge with *Escherichia coli* endotoxin. *J. Anim. Sci.*, 72, Suppl 1 / *J. Dairy Sci.*, 77, Suppl. 1: 198.
- HARMON, R.J.; Clark, T.W.; Smith, B.A.; Trammell, D.S.; Torre, P.M.; Akers, K.; Langlois, B.E e Hemken, R.W. (1994c).). Influence of copper status in heifers on response to intrammary challenge with *Staphylococcus aureus*. *J. Anim. Sci.*, 72, Suppl 1 / *J. Dairy Sci.*, 77, Suppl. 1: 198.
- HARMON, R.J. (1998). Trace minerals and dairy cattle: importance for udder health. *Biotechnology in the Feed Industry*, Proceedings of the 14th Annual Symposium (T. P. Lyons and K.A. Jackes, eds). Nottingham University Press, U.K.: 485-495.
- HAVERI, M.; Roslöf, A.; Rantala, L. e Pyörälä, S. (2005a). Toxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection of different clinical characteristics and outcome. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 149-154.

- HAVERI, M.; Suominen, S.; Rantala, L.; Honkanen-Buzalski, T. e Pyörälä, S. (2005b). Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. Vet Microbiol., 106: 97-102.
- HÉBERT, A.; Sayasith, K.; Sénèchal, S.; Dubreuil, P. e Lagacé, J. (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiol. Lett., 193: 57-62.
- HEINZELMANN, M.; Herzig, D.O.; Swain, B.; Mercer-Jones, M.A.; Bergamini, T.M. e Polk Jr, H.C. (1997). Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4 (6): 705-710.
- HENRIQUES, R. (1969). Ordenha mecânica. Direcção Geral dos Serviços Pecuários – Serviços de Assistência Técnica e Vulgarização. Ed: Tipografia Mcarlo Lda., Lisboa.
- HENSEN, S.M.; Pavicic, M.J.A.M.P.; Lohuis, J.A.C.M. e Poutrel, B. (2000). Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. J. Dairy Sci., 83: 418-429.
- HO, G.; Campbell, W.H.; Bergdoll, M.S. e Carlson, E. (1989). Production of toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* strains associated with sheep, goats and cows. J. Clin. Microbiol., 27 (9): 1946-1948.
- HOFER, E.; Winter, P. e Baumgartner, W. (1995). Coagulate-negative Staphylococci as pathogens of subclinical and clinical mastitis in three flocks of milk sheep. Proceedings of the 3rd IDF International Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel, Book 2: 96-97.
- HOGAN, J.S.; Weiss, W.P. e Smith, K.L. (1993). Role of vitamin E and selenium in host defence against mastitis. J. Dairy Sci., 76 (9): 2795-2803.
- HOLT, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. e Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edição. Ed: Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-00603-7.
- HORSTKOTTE, M.A.; Knobloch, J.K.-M.; Rohde, H.; Dobinsky, S. e Mack, D. (2002). Rapid detection of methicillin resistance in coagulate-negative *Staphylococci* with the Vitek 2 system. J. Clin. Microbiol., 40 (9): 3291-3295.
- HUESTON, W.D.; Boner, G.J. e Baertsche, S.L. (1989). Intramammary antibiotic treatment at the end of lactation for prophylaxis and treatment of intramammary infections in ewes. J.A.V.M.A., 194 (8): 1041-1044.
- INDREBØ, A. (1990). Mastitis in the ewe. Tese de Doutorado, Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Noruega.

- ISHIKAWA, H.; Shimizu, T.; Hirano, H.; Saito, N. e Nakano, T. (1982). Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment with levamisole. J. Dairy Sci., 65 (4): 653-658.
- ITURRALDE, M.; Aguilar, B.; Baselga, R. e Amorena, B. (1993). Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line. Vet. Microbiol. 38: 115-127.
- JACOBS, R.F. e Wilson, C.B. (1983). Intracellular penetration and antimicrobial activity of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., 12 (Suppl. C): 13-20.
- JONES, J.E.T. (1991). Mastitis in sheep. De "Breeding for Disease Resistance in Farm Animals". Eds. J. B. Owen & R. F. Axford: 412-423.
- JØRGENSEN, H.J.; Mørk, T.; Caugant, D.A.; Kearnes, A. e Rørvik, L.M. (2005). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. Appl. Environ. Microbiol., 71 (12): 8352-8361.
- JUNI, E. (1984). Genus III. *Acinetobacter*. Brison and Prévot, 1954, 727^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 303-307.
- KABAY, M.J. e Ellis, T.M. (1989). Intraperitoneal inoculation of ewes with na autogenous vaccine to prevent mastitis due to *Pasteurella haemolytica*. Aust. Vet. J., 66 (10): 342 – 343.
- KARADZHOV, I.; Mekhandzhiiska, L. e Gerganova, E. (1981). Coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of cows with subclinical mastitis. Vet. Med. Nauki, 18 (9): 51-54.
- KASPAR, H. (2006). Results of the antimicrobial agent susceptibility study raised in a representative, cross-sectional monitoring study on a national basis. Int. J. Med. Microbiol., 296 (S2): 69-79.
- KEHRLI, M.E.; Goff, J.P.; Stevens, M.G. e Boone, T.C. (1991). Effects of granulocyte-colony stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. J. Dairy Sci., 74 (8): 2448-2458.
- KEHRLI, M.E. e Harp, J.A. (2001). Immunity in the mammary gland. Vet. Clin. North Am.: food Animal Practice, 17 (3): 495-516.
- KEISLER, D.H.; Andrews, M.L. e Moffatt, R.J. (1992). Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. J. Anim. Sci, 70 (6): 1677-1681.

- KILIAN, M. e Biberstein, E.L. (1984). Genus II. *Haemophilus*. Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1917, 561^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 558-569.
- KITCHEN, B.J.; Middleton, G. e Salmon, M. (1978). Bovine milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. J. Dairy Res., 45: 15-20.
- KLEMENT, E.; Chaffer, M.; Leitner, G.; Shwimmer, A.; Friedman, S.; Saran, A. e Shpigel, N. (2005). Assessment of accuracy of disk diffusion tests for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogens: a novel approach. Microb Drug Resist 11: 342-350.
- KLOOS, W.E e Schleifer, K.H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1013-1035.
- KOCUR, M. (1986). Genus I. *Micrococcus* Cohn 1872, 151^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1004-1008.
- KOMINE, Y.; Komine, K.; Kai, K.; Itagaki, M.; Kuroishi, T.; Aso, H.; Obara, Y. e Kumagai, K. (2006). Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. J. Vet. Med. Sci., 68 (3): 205-211.
- KUROISHI, T.; Komine, K.; Kai, K.; Itagaki, M.; Kobayashi, J.; Ohta, M.; Kamata, S. e Kumagai, K. (2003). Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. J. Vet. Med. Sci., 65 (8): 899-906.
- LACETERA, N.; Bernabucci, U.; Ronchi, B e Nardone, A. (1999). The effects of injectable sodium selenite on immune function and milk production in sardinian sheep receiving adequate dietary selenium. Vet. Res., 30 (4):363-370.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- LAHOUASSA, H.; Riollet, C. e Rainard, P. (2005). Differential cytokine/chemokine expression from mammary epithelial cells stimulated by different *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 749.
- LAHOV, E. e Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. Food Chem. Toxicol., 34 (1): 131 – 145.

- LAMMERS, A.; Nuijten, P.J.M.; Kruijt, E.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Vecht, U.; Smith, H.E. e van Zijderveld, F.G. (1999a). Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. Vet Microbiol., 67: 77-89.
- LAMMERS, A.; Nuijten, P.J.M. e Smith, H.E. (1999b). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. FEMS Microbiol. Lett.; 180: 103-109.
- LAMMERS, A.; Van Vorstenbosch, C.J.; Erkens, J.H.F. e Smith, H.E. (2001). The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. Vet. Microbiol., 80: 255-265.
- LANYON, M. (1989). Mastitis. Sheep Dairy News, 34 (6)
- LARSGARD, A.G. e Vaabenoe, A. (1993). Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. Small Rumin. Res., 12: 339-347.
- LAS HERAS, A.; Domínguez, L. e Fernández-Garayzábal, J.F. (1999a). Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. Small rumin. Res., 32: 21-29.
- LAS HERAS, A.; Domínguez, L.; López, I. e Fernández-Garayzábal, J.F. (1999b). Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. Vet. Rec., 145: 111-112.
- LAS HERAS, A.; Fernández-Garayzábal, J.F.; Legaz, E.; López, I. e Domínguez, L. (1999c). Importance of subclinical mastitis in milking sheep and diversity of aetiological agents. Milking and milk production of dairy sheep and goats. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 137-141.
- LAS HERAS, A.; Fernández, E.; López, I.; Domínguez, L.; Collins, M.D. e Fernández-Garayzábal, J.F. (1999d). New bacterial pathogens associated with mastitis in sheep. Milking and milk production of dairy sheep and goats. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 185-187.
- LAS HERAS, A.; Domínguez, L.; López, I. Payá, M.J.; Peña, L.; Mazzucchelli, F.; García, L.A. e Fernández-Garayzábal, J.F. (2000). Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy. Vet. Rec., 147: 578-580.
- LAS HERAS, A.; Fernández-Garayzábal, J.F.; Legaz, E.; López, I. e Domínguez, L. (2001). Empleo de autovacunas para el control de la mamitis en explotaciones intensivas de ovejas Assaf. Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Sevilla. [www. exoplol.com/general/circulares/64circ.html](http://www.exoplol.com/general/circulares/64circ.html). Consultado em Janeiro, 2006.

- LAS HERAS, A.; Vela, A.I.; Fernández, E.; Legaz, E.; Domínguez, L. e Fernández-Garayzábal, J.F. (2002). Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. J. Clin. Microbiol., 40 (3): 1106-1108.
- LASCELLES, A.K. (1979). The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. J. Dairy Sci., 62 (1): 154-160.
- LAWS, L. e Elder, J.K. (1969). Mastitis in sheep caused by *Actinobacillus lignieresii*. Aust. Vet. J., 45 (9): 401-403.
- LEE, J.W.; Huang, M.K.; Roy, M. e Zhao, X. (2005). Identification of novel genes expressed in bovine mammary epithelial cells in response to *Staphylococcus aureus* cell wall components by differential display. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 777.
- LEIGH, J.A. (1993). Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol. Lett., 144: 67-71.
- LEIGH, J.A.; Hodgkinson, S.M. e Lincoln, R.A. (1998). The interaction of *Streptococcus dysgalactiae* with plasmin and plasminogen. Vet Microbiol., 61: 121-135.
- LEIGH, J.A.; Ward, P.N. e Field, T.R. (2004). The exploitation of the genome in the search for determinants of virulence in *Streptococcus uberis*. Vet. Immunol. Immunopathol., 100: 145-149.
- LEITNER, G.; Yadlin, B.; Glickman, A.; Chaffer, M. e Saran, A. (2000). Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. Res. Vet. Sci., 69: 181-184.
- LEITNER, G.; Chaffer, M.; Zamir, S.; Mor, T.; Glickman, A.; Winkler, M.; Weisblit, L. e Saran, A. (2001). Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in israeli assaf sheep throughout lactation. Small Rumin. Res., 39: 107-112.
- LEITNER, G.; Chaffer, M.; Shamay, A.; Shapiro, F.; Merin, U.; Ezra, E.; Saran, A. e Silanikove, N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. J. Dairy Sci., 87: 46-52.
- LEITNER, G. (2005). The mammary gland defense system and mucosal immunity. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 760.

- LESTER, C.H.; Frimodt-Møller, Sørensen, T.L.; Monnet, D.L. e Hammerum, A.M. (2005). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterobacter faecium* strain of animal origin to a human *E. faecium* in the intestine of human volunteers. De "DANMAP 2005 – Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark". Ed: O.E. Heuer e A.M. Hammerum. ISSN: 1600-2032.
- LEWIS, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 45 (4): 999-1007.
- LIGOZZI, M.; Bernini, C.; Bonora, M.G.; Fatima, M.; Zuliani, J. E Fontana, R. (2002). Evaluation of the Vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-positive cocci. J. Clin. Microbiol., 40 (5): 1681-1686.
- LINDAHL, M.; Holmberg, O. e Jonsson, P. (1990). Adhesive proteins of haemagglutinating *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J. Gen. Microbiol., 136: 935-939.1
- LING, T.K.W.; Tam, P.C.; Liu, Z.K. e Cheng, A.F.B. (2001). Evaluation of the Vitek 2 rapid identification and susceptibility testing system against Gram-negative clinical isolates. J. Clin. Microbiol., 39 (8): 2964-2966.
- LINTNER, T.J. e Eberhart, R.J. (1990a). Effects of bovine mammary secretion during early nonlactating period and antibiotics on polymorphonuclear neutrophil function and morphology. A. J. Vet. Res., 51 (4): 524-532.
- LINTNER, T.J. e Eberhart, R.J. (1990b). Effects of antibiotics on phagocyte recruitment, function, and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlactating period. A. J. Vet. Res., 51 (4): 533-542.
- LIVERMORE, D.M. e Williams, J.D. (1996). β -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. De "Antibiotics in Laboratory Medicine" (4ª edição). Ed: Victor Lorian, Williams & Wilkins, USA. ISBN: 0-683-05169-5.
- LOHUIS, J.A.C.M.; Berthelot, X.; Cester, C.; Perez, V. e Aguer, D. (1995). Pharmacokinetics and milk residues of penicillin, nafcillin and dihydrostreptomycin in dairy sheep treated with nafpenzal'dc at drying-off. Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk, Kiel, Alemanha, Agosto de 1995: 64-68.
- LOWELL, G.H. (1990). Proteosomes, hydrophobic anchors, Iscoms, and liposomes for improved presentation of peptide and protein vaccines. De "New Generation Vaccines". Ed: G.C. Woodrow e M.M. Levine, Marcel Dekker, Inc., New York, USA. ISBN: 0-8247-8207-0.

- LÜTHJE, P. e Schwartz, S. (2006). Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincisamide resistance phenotypes and genotypes. J. Antimicrob. Chemother., 57: 966-969.
- MACKIE, D.P.; Meneely, D.J.; Pollock e Logan, E.F. (1986). The loss of opsonic activity of bovine milk whey following depletion of IgA. Vet Immunol. Immunopathol., 11 (2): 193-198.
- MADGWICK, L.; Mayer, S. e Keen, P. (1989). Penetration of antibiotics into bovine neutrophils and their activity against intracellular *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother., 24 (5): 709-718.
- MAIRA-LITRÁN, T.; Kropec, A.; Abeygunawardana, C.; Joyce, J.; Mark III, G.; Goldmann, D.A. e Pier, G.B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. Infect. Immun., 70 (8): 4433-4440.
- MARCO, J.C.; Romeo, M.; Esnal, A.; Salazar, M. e Gonzalez, L. (1993) Survey of intramammary infections in Latxa ewes. Proceedings of the Sheep Veterinary Society, vol.17: 228.
- MARGUET, E.R.; Vilanova, C.P. e Salgado, E. (2000). Estudio de mastitis subclínicas en un rodeo ovino lechero. Rev. Vet. Arg., 163: 190-197.
- MATTHEWS, K.R.; Rejman, J.J.; Turner, J.D. e Oliver, S.P. (1994). Proliferation of bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors. J. Dairy Sci., 77: 2959-2964.
- MAURIN, M. e Raoult, D. (2001). Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 45 (11): 2977-2986.
- MAVROGIANNI, V.S.; Cripps, P.J.; Tzora, A.; Skoufos, I. e Fthnakis, G.C. (2006). Effects of hand milking on the bacterial flora of mammary gland and teat duct of ewes. J. Dairy Res., 7 (3): 353-356.
- MAVROGENIS, A.P.; Koumas, A.; Kakoyiannis, C.K. e Taliotis, C.H. (1995). Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. Small Rumin. Res., 17: 79-84.
- McCARTHY, F.D.; Lindsey, J.B.; Gore, M.T. e Notter, D.R., (1988). Incidence and control of subclinical mastitis in intensively managed ewes. J. Anim. Sci., 66: 2715-2721.
- McCORMICK, J.K.; Yarwood, J.M. e Schlievert, P.M.. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu. Rev. Microbiol., 55: 77-104.
- McDONNELL, A.M. e Holmes, L.A. (1990). Haemoglobinuria due to *Clostridium perfringens* type A mastitis in a ewe. Br. Vet. J., 146 (4): 380-381.

- McDOUGALL, S.; Murdough, P.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J. e Scruton, D. (2001). Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. Small Rumin. Res., 40: 245-254.
- McDOUGALL, S. e Anniss, F. (2005). Efficacy of antibiotic treatment at drying-off in curing existing infections and preventing new infections in dairy goats. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 523-528.
- McKENNEY, D.; Hubner, J.; Muller, E.; Wang, Y.; Goldmann, D.A. e Pier, G.B. (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect. Immun., 66 (10):4711-4720.
- MEDZHITOV, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. Nature Rev. Immunol., 1: 135-145.
- MEHRZAD, J.; Zhao, X. e Burvenich, C. (2005). Free radicals during *E. coli* mastitis: Friends or foes?. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 751.
- MELCHIOR, M.B.; Vaarkamp, H. e Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? Vet. J., 171: 398-407.
- MENZIES, P.I. e Ramanoon, S.Z. (2001). Mastitis of sheep and goats. Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract., 17 (2): 333-358.
- MORGANTE, M.; Beghelli, D.; Pauselli, M. ; DallAra, P. ; Capuccella, M. e Ranucci, S. (1999). Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. J. Dairy Sci., 82 (3): 623-631.
- MØRK, T.; Tollersrud, T.; Kvitle, B.; Jørgensen, H.J. e Waage, S. (2005). Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. Vet. Microbiol., 106 : 265-273.
- MORONI, P. e Cuccuru, C. (2001). Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. Small Rum. Res., 41: 1-7.
- NAVARRE, W.W. e Schneewind, O. (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63 (1): 174-229.
- NCBI (2006). The NCBI Taxonomy Homepage. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>. Consultado em Novembro de 2006.

- NCCLS (1994). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourth informational supplement. NCCLS publication M100-S4, Vol. 14, n° 16. ISBN: 1-56238-249-7.
- NCCLS (2002). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard – second edition. NCCLS publication M31-A2, Vol. 22, n° 6. ISBN: 1-56238-461-9.
- NDEGWA, E.N.; Mulei, C.M. e Munyua, S.J. (2001). Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya. J. S. Afr. Assoc., 72 (2): 97-98.
- NICKERSON, S.C.; Pappé, M.J. e Dulin, A.M. (1985). Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leucocyte morphologic features, viability and phagocytic activity *in vitro*. A. J. Vet. Res., 46 (11): 2259-2265.
- NICKERSON, S.C. (1989a). Immunological aspects of mammary involution. J. Dairy Sci., 72 (6): 1665-1678.
- NICKERSON, S.C.; Baker, P.A. e Trinidad, P. (1989b). Local immunostimulation of the bovine mammary gland with interleukin-2. J. Dairy Sci., 72 (7): 1764-1773.
- NICKERSON, S.C.; Owens, W.E. e Watts, J.L. (1989c). Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cows. J. Dairy Sci., 72 (12): 3286-3294.
- NICKERSON, S.C.; Boddie, R.L.; Owens, W.E. e Watts, J.L. (1990). Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge. J. Dairy Sci., 73: 2774 – 2784.
- NMC (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis. Revised Edition. National Mastitis Council, Inc.
- NOBLE, W.C.; Rahman, M.; Karadec, T. e Schwarz, S. (1996). Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. Vet. Microbiol., 52 (1-2): 143-152.
- NUNES, S.F.; Couto, I.; Bexiga, R.; Oliveira, M.; Cavaco, L.M.; Lencastre, H. e Vilela, C.L. (2006a). Screening of methicillin-resistance in bovine mastitis staphylococci. In: World Buiatrics Congress 2006, Nice, France.
- NUNES S.F.; Bexiga R.; Cavaco L.M.; Oliveira M. e Vilela C.L. (2006b). Pitfalls of antimicrobial susceptibility testing of mastitis pathogens by disk diffusion method. In: World Buiatrics Congress 2006, Nice, France.

- O'BRIEN, C.N.; Guidry, A.J.; Douglass, L.W. e Westhoff, D.C. (2001). Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. J. Dairy Sci., 84 (8): 1791-1799.
- O'GARA, J.P. e Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. Med. Microbiol, 50: 582-587.
- OLDHAM, E.R. e Daley, M.J. (1991). Lysostaphin: Use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. J. Dairy Sci., 74 (12): 4175-4182.
- OLIVEIRA, A.P.; Watts, J.L.; Salmon, S.A. e Aerestrup, F.M. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. J. Dairy Sci., 83 (4): 855-862.
- OLIVER, S.P.; Almeida, R.A e Calvinho, L.F. (1998). Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. J. Vet. Med. (series B) 45 (8): 461-471.
- OLIVER, S.P.; Luther, D.A.; Park, H.M. e Almeida, R.A. (2005a). Identification, isolation, characterization and elucidation of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 772.
- OLIVER, S.P.; Tamilselvam, B.; Srinivasan, V.; Luther, D.A.; Gillespie, B.E. e Almeida, R.A. (2005b). Identification of beta-defensin genes in bovine mammary epithelial cells. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 836.
- OMOE, K.; Hu, D.L.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A. e Shinagawa, K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect. Immun., 71: 6088–6094.
- ORDEN, J.A.; Cid, D.; Blanco, M.E.; Ruiz Santa Quiteria, J.A.; Gomez-Lucia, E. e De La Fuente, R. (1992a). Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-one production by *Staphylococci* isolated from mastitis in sheep. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 100 (2): 132-134.
- ORDEN, J.A.; Goyache, J.; Hernandez, J.; Domenech, A.; Suarez, G. e Gomez-Lucia, E. (1992b). Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. J. Appl. Bacteriol., 72 (6): 486-489.

- ORDEN, J.A.; Goyache, J.; Hernandez, J.; Domenech, A.; Suarez, G. e Gomez-Lucia, E. (1992c). Production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1 by coagulase negative *Staphylococci* isolated from ruminant mastitis. J. Vet. Med., 39 (2): 144-148.
- ØRSKOV, F. (1984). Genus I. *Escherichia*. Castellani and Chalmers, 1919, 941^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 420-423.
- ØRSKOV, I. (1984). Genus V. *Klebsiella*. Trevisan, 1885, 105^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 461-465.
- ORWIN, P.M.; Leung, D.Y.; Donahue, H.L; Novick., R.P. e Schlievert, P.M. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect. Immun., 69: 360–366.
- OTERO, A., García, M.C.; Gercía, M.L. e Moreno, B. (1987). Production of staphylococcal enterotoxins C₁ and C₂ and thermonuclease in ewe's milk. Food Microbiol., 4: 339-345.
- OUTTERIDGE, P.M. e Lee, C.S. (1988). The defence mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. Prog. Vet. Microbiol. Immunol., 4: 165-196.
- OVIDO-BOYSO, J.; Valdez-Alarcón, J.J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E.; Bravo-Patiño, A. E Baizabal-Aguirre, V.M. (2006). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect., *in press*.
- OWENS, W.E.; Watts, J.L.; Greene, B.B. e Ray, C.H. (1990). Minimum inhibitory concentration and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against streptococci isolated from bovine intramammary infections. J. Dairy Sci., 73 (5): 1225-1231.
- PAAPE, M.J.; Miller, R.H. e Ziv, G. (1991). Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. A. J. Vet. Res., 52 (2): 363-366.
- PAAPE, M.J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A.V.; Van Oostveldt, K. e Burvenich, C. (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. Adv. Exp. Med. Biol., 480: 259-277.
- PAAPE, M.J.; Poutrel, B.; Contreras, A. ; Marco, J.C. e Capuco, A.V. (2001). Milk somatic cells and lactation in small ruminants. J.Dairy Sci. 84 (E. Suppl.): E236-E244.
- PALLERONI, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. Migula, 1894, 237^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 141-199.

- PAVICIC, Z.; Tomaskovic, A.; Tofant, A.; Balenovic, T.; Cergolj, M. e Prvanovic, N. (2005). Significance of udder sanitation on total number of bacteria at teats and milk of ewes. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 932.
- PENADÉS, J.R.; Albizu, I.; Baselga, R.; Marco, J.; Barberán, M. e Amorena, B. (1993). Role of intramammary device in protection against experimentally induced staphylococcal mastitis in ewes. Am. J. Vet. Res., 54 (5): 732 – 737.
- PENGOV, A. (2001). The role of coagulase-negative *Staphylococcus spp.* and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. J. Dairy Sci., 84 (3): 572-574.
- PENNER, J.L. (1984). Genus XI. *Proteus*. Hauser, 1885, 12^{AL}. De “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 491-494.
- PÉREZ, V.; Corpa, J.M.; García Marín, J.F. ; Adúriz, J.J. e Jensen, H.E. (1998). Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. Vet. Pathol., 35 (4): 235-240.
- PEREZ-CASAL, J.; Kerro-Dego, O.; Prysliak, T.; Mutwiri, G. e Potter, A.A. (2005). Construction of a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potencial as a target antigen for protection against mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 767.
- PERIS, C.; Díaz, J.R. e Fernández, N. (2001). Influencia del ordeño mecánico sobre la mamitis en pequeños ruminantes. Mecanismos involucrados. Pequeños Rumin., 2 (2): 18-24.
- PETRELLI, D.; Zampaloni, C.; D’Ercole, S.; Prenna, M.; Ballarini, P.; Ripa, S. e Vitali, L.A. (2006). Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 25 (12): 773-781.
- PFEIFFER, D.; Lloyd, D.; Loeffler, A.; Soares-Magalhaes, R.; Rich, M.; Roberts, L. e Lindsay, J. (2005). Investigation of MRSA in small animal practice. Vet Rec. 157: 179-180.
- PHILLIPS, J.E. (1984). Genus III. *Actinobacillus*. Brumpt, 1910, 849^{AL}. De “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 570-575.
- PHILPOT, W.N. (1984). Mastitis Management. (2ª edição). Ed: Babson Bros. Co., Illinois, U.S.A.
- PIDDOCK, L.J.V. (1996). Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother., 38: 1-3.

- PITKALA, A.; Haveri, M.; Pyorala, S.; Myllys, V. e Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci., 87 (8): 2433-2441.
- PÖHLMANN-DIETZE, P.; Ulrich, M.; Kiser, K.B.; Döring, G.; Lee, J.C.; Fournier, J.-M.; Botzenhart, K. e Wolz, C. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: Influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. Infect. Immun., 68 (9): 4865-4871.
- POTES, M.E. (2000). Microbiologia do queijo artesanal produzido na região de Évora. Tese de Doutorado, Universidade de Évora, Portugal.
- POYART, C.; Quesne, G. e Trieu-Cuot, P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. Int. J. Syst. and Evol. Microbiol., 52: 1247-1255.
- PRESCOTT, L.M.; Harley, J.P. e Klein, D.A. (2002). Microbiology (5ª edição). Ed: McGraw Hill. ISBN: 0-07-112259-1.
- PYÖRÄLÄ, S. (2002). Antimicrobial treatment of mastitis – choice of the route of administration and efficacy. Proceedings of the British Mastitis Conference, Brockworth: 20-29.
- QUINTANA, A.M.V. e Martín M.I.R. (2005). Influence of somatic cell count on hard ewe's milk cheese. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 918.
- RADOSTITS, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. e Hinchcliff, K.W. (2000). Veterinary Medicine (9ª edição). Ed: W.B. Saunders. ISBN: 0-7020-26042.
- RAINARD, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. Vet. Res., 34: 647-670.
- RAINARD, P. e Poutrel, B. (1993). Protection immunitaire de la glande mammaire. De "Biologie de la lactation". Eds: J. Martinet e L.M. Houdebine, Editions INSERM/INRA, França. ISBN INSERM: 2-85598-522-6; ISBN INRA: 2-7380-0427-X. Pp : 415-429.
- RAINARD, P.; Corrales, J.C.; Barrio, M.B.; Cochard, T. e Poutrel, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV Leukotoxin. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10 (2): 272-277.
- RAINARD, P. e Riollot, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet. Res., 37 : 369-400.

- RAJALA-SCHULTZ, P.J.; Trres, A.; Rajeev, S.; DeGraves, F.J. e Silveira, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* isolated at dry-off and calving. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 684-687.
- RAPOPORT, E.; Vishinsky, Y.; Hanoch, U.; Faingold, D.; Shani, A.; Hatib, N. e Kussak, A. (1999). Outbreaks of acute ovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Milking and milk production of dairy sheep and goats. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 192-195.
- REDDY, P.J.; Morril, J.L. e Frey, R.A. (1987). Vitamin E is immunostimulatory in calves. J. Dairy Sci., 70 (5): 993-999.
- REDETZKY, R.; Hamann, J.; Grabowski, N.T. e Klein, G. (2005). Diagnostic value of the California mastitis test in comparison to electronically-counted somatic cells in bovine milk. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 487-494.
- RICHARD, C. (1984). Genus VI. *Enterobacter*. Hormaeche and Edwards, 1960, 72^{AL}. De "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 1. Ed: N.R. Krieg; J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-04108-8 (v.1): 465-469.
- RIOLLET, C.; Rainard, P. e Poutrel, B. (2000). Differential induction of complement C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7 (2): 161-167.
- ROBERTS, M.C.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P.; Jensen, L.B.; Rood, J. e Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother., 43 (12): 2823-2830.
- ROITT, I; Brostoff, J. e Male, D. (1993). Immunology. (3ª edição) Ed: Mosby-Year Book Europe Ltd, England. ISBN: 0-397-44765-5.
- ROMEO, M; Ziluaga, I e Marco, J.C. (1998). Diagnóstico *in situ* de la infección mamaria mediante palpación, california mastitis test y su seguimiento mediante recuento de células somáticas. Ovis, 59: 61-77.
- ROSSI, J.; Gobbetti, M.; Buzzini, P. e Corsetti, A. (1994). Influenza delle alterazioni patologiche del latte sul processo di caseificazione. Il Latte, 9: 904-915.
- ROSSITTO, P.V.; Ruiz, L.; Kikuchi, Y.; Glenn, K.; Luiz, K.; Wats, J.L. e Cullor, J.S. (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in Central California dairies. J. Dairy Sci., 85 (1): 132-138

- ROTH, J.A.; Frank, D.E.; Weighner, P. e Weighner, M. (2001). Enhancement of neutrophil function by ultrafiltered bovine whey. J.Dairy Sci., 84 (4): 824-829.
- RUOFF, K.L. (2002). Miscellaneous catalase-negative, Gram-positive cocci: Emerging opportunists. J. Clin. Microbiol., 40: 1129-1133.
- RYAN, M.P.; Meaney, W.J.; Ross, R.P. e Hill, C. (1998). Evaluation of Lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 64 (6): 2287 – 2290.
- SAA, E e Kruze, J. (1995). Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin. Rev. Lat.-Amer. Microbiol., 37: 201-208.
- SAIANDA, I.M. (1997). Oligoelementos e defesas locais: Influência da biodisponibilidade do zinco na manutenção das defesas locais na glândula mamária. Tese de Mestrado, Universidade de Évora, Portugal.
- SAIANDA, I.M.; Bettencourt, C.M.V.; Queiroga, M.C.; Ferreira-Dias, G. e Vilela, C. L. (1999). Possible role of trace elements in mammary gland colonisation. Proceedings of the VII Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Santarém, Portugal: 83-88.
- SAMPIMON, O.; Sol, J. e Kock, P. (2005a). Changes in bulk milk somatic cell count and in mastitis pathogens over the past 50 years in The Netherlands. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 963.
- SAMPIMON, O.; Sol, J.; Barkema, H.; Kock, P. e Mevius, D. (2005b). Species-specific antimicrobial sensitivity of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples in 2002-2004 in The Netherlands. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 895.
- SAN MARTIN, B.; Kruze, J.; Morales, M.A.B.; Agüero, H.; Leon, B.; Espinoza, S.; Iragüe, D.; Puga, J. e Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet., 34 (2): 221-234.
- SANCHEZ, M.S.; Ford, C.W. e Yancey, R.J. (1988). Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. J. Antimicrob. Chemother., 21 (6): 773-786.
- SANCHEZ, L.; Lujan, L.; Oria, R.; Castillo, H.; Perez, D.; Ena, J.M. e Calvo, M. (1992). Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. J. Dairy Sci., 75: 1257 – 1262.

- SANCHEZ, M.S.; Ford, C.W. e Yancey Jr., R.J. (1994). Effect of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and antibiotics on the killing of intracellular *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci., 77 (5): 1251-1258.
- SANDHOLM, M.; Kaartinen, L. e Pyörälä, S. (1990). Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? An overview. J. Vet. Pharmacol. Therap., 13: 248-260.
- SAS (1991). SAS Systems for linear models. Statistical Analysis Systems Institute, Inc., Cary, NC, 329 pp.
- SCHALM, O. A.; Carroll, E. J. e Jain, N. C. (1971). Bovine Mastitis. Ed: Lea & Febiger, Philadelphia, USA. ISBN 0-8121-0332-7.
- SCHMIDT, H. e Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev., 17: 14–56.
- SCHODER, D.; Winter, P.; Kareem, A.; Baumgartner, W. e Wagner, M. (2003). A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw-milk cheeses produced in the on-farm dairy. J. Dairy Res., 70 (4): 395-401.
- SCOTT, P.R. (2000). Extensive fibrinous pleurisy associated with *Streptococcus dysgalactiae* mastitis in two ewes. Vet. Record, 146: 347-349.
- SCRUTON, D.L. (2002). Somatic cell counts and mammary infections on small ruminant dairies in Vermont. Proceedings of the 8th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, 7-9 Nov., Cornell University, Ithaca, New York: 141-142.
- SEARS, P.M.; Fettingner, M. e Marsh-Salin, J. (1987). Isolation of L-form variants after antibiotic treatment in *Staphylococcus aureus* bovine mastitis. JAVMA, 191 (6): 681-684.
- SEELIGER, H.P.R. e Jones, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL}. De “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, Volume 2. Ed: P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe e J.G. Holt. Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-07893-3 (v.2): 1235-1245.
- SELSTED, M.E.; Tang, Y.Q.; Morris, W.L.; McGuire, P.A.; Nonotny, M.J.; Smith, W.; Henschen, A.H. e Cullor, H.S. (1993). Purification, primary structures and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. J. Biol. Chem., 268 (9): 6641-6648.
- SHARMA, M. e Malik, R.K. (2005). Bacteriocin lacticin 386 based preparation as a safe alternative to antibiotics for mastitis control. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 832.

- SHKRETA, L.; Talbot, B.G.; Diarra, M.S. e Lacasse, P. (2004). Immune response to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 23: 114-126.
- SHOOP, D.S. e Myers, L.L. (1984). Serologic analysis of isolates of *Pasteurella haemolytica* and *Staphylococcus aureus* from mastitic ewes. *Am. J. Vet. Res.*, 45 (10): 1944-1946.
- SHUSTER, D.E.; Harmon, R.J.; Jackson, J.A. e Hemken, R.W. (1991a). Endotoxin mastitis in cows milked four times daily. *J. Dairy Sci.*, 74: 1527-1538.
- SHUSTER, D.E.; Harmon, R.J.; Jackson, J.A. e Hemken, R.W. (1991b). Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.*, 74: 3763-3774.
- SHUSTER, D.E.; Kehrlí Jr., M.E. e Stevens, M.G. (1993). Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (1): 80-85.
- SHUSTER, D.E. e Kehrlí Jr., M.E. (1995). Administration of recombinant human interleukin 1 receptor antagonist during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.*, 56 (3): 313-320.
- SHUSTER, D.E.; Kehrlí Jr, M.E.; Rainard, P. e Paape, M. (1997). Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 65 (8): 3286-3292.
- SILANIKOVE, N.; Shapiro, F.; Leitner, G. e Merin, U. (2005). Subclinical mastitis affects the plasmin system, milk composition and curd yield in sheep and goats: comparative aspects. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 511- 516.
- SILVA, E.R. da; Carmo, L.S. do e Silva, N da (2005). Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet. Microbiol.*, 106: 103-107.
- SIMONSEN, S. e Sølverød, L. (2005). Variation of quarter milk somatic cell count analysed with California mastitis test and fossomatic 360 related to time from sampling. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 890.
- SLOOT, N.; Thomas, M.; Marre, R. e Gatermann, S. (1992). Purification and characterization of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.*, 37 (3): 201-205.
- SMIKO, S. (1993). The presence of *Staphylococcus aureus* in hrudkovy ewe milk cheese in regional conditions in Central Slovakia. *Veterinarstvi*, 43(1): 29-32.

- SMITH, J.L.; Hogan, J.S. e SMITH, K.L. (1999). Efficacy of intramammary immunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin. J. Dairy Sci., 82 (12): 2582-2588.
- SMITH, K.L. (2005). Mastitis research and control: Where do we come from and where are we going?. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 23-30.
- SOL, J.; Sampimon, O.; Baptiste, K.; Barkema, H. ; Kock, P. e Mevius, D. (2005). Sensitivity patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from randomly collected subclinical bovine mastitis cases in The Netherlands from 1973-2004. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 826.
- SOLTYS, J. e Quinn, M.T. (1999). Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: Analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. Infect. Immun., 67 (12): 6293-6302.
- SONG, X.M.; Perez-Casal, J.; Bolton, A. e Potter, A.A. (2001). Surface-expressed Mig protein protects *Streptococcus dysgalactiae* against phagocytosis by bovine neutrophils. Infect. Immun., 69 (10): 6030-6037.
- SORDILLO, L.M e Nickerson, S.C. (1988). Quantification and immunoglobulin classification of plasma cells in nonlactating bovine mammary tissue. J. Dairy Sci., 71 (1): 84-91.
- SORDILLO, L.M.; Campos, M. E Babiuk, L.A. (1991). Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2. J.Dairy Sci., 74 (10): 3370-3375.
- SORDILLO, L.M.; Shafer-Weaver, K. e DeRosa, D. (1997). Immunology of the Mammary Gland. J. Dairy Sci., 80 (8): 1851-1865.
- SPAIN, J. (1993). Tissue integrity: a key defence against mastitis infection: the role of zinc proteinates and a theory for mode of action. Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of the 9th Annual Symposium (T. P. Lyons, ed) U.S.A.: 27-33.
- SPAIN, J.N.; Jones, C.A.; Rapp, C.; Socha, M.T. e Tomlinson, D.J. (2005). The effect of complexed zinc on keratin synthesis in the teat canal and the establishment and severity of experimentally induced *E. coli* mastitis in dairy cows. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 948.
- SRINIVASAN, V.; Gillespie, B.E.; Headrick, S.J.; Nam, H.M.; Nguyen, L.T. e Oliver, S.P. (2005). Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus spp.* isolated from cows with clinical mastitis. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 981.

- STACKEBRANDT, E.; Koch, C.; Gvozdiak, O. e Schumann, P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. Int. J. Syst. Bacteriol., 45 (4): 682-692.
- STEFANAKIS, A.; Boscós, C.; Alexopoulos, C. e Samartzi, F. (1995). Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes milk in Northern Greece. Anim. Sci., 61: 69-76.
- STONE, D.B.; Armstrong, R.W.; Macrina, D.M. E Pankau, J.W. (1999). Introdução à epidemiologia. Ed: McGraw-Hill de Portugal, L.^{da}. ISBN: 972. 773. 002. 7.
- STRATTON, C.W. (1996). Mechanisms of action for antimicrobial agents: general principals and mechanisms for selected classes of antibiotics. De "Antibiotics in Laboratory Medicine" (4^a edição). Ed: Victor Lorian, Williams & Wilkins, USA. ISBN: 0-683-05169-5.
- SUK-KYUNG, L.I.M.; Yi-seok, J.O.O.; Jin-san, M.O.O.N.; Ae-ri, L.E.E.; Hyang-mi, N.A.M.; Sung-hwan, W.E.E. e Hong-bum, K.O.H. (2004). Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. J. Vet. Med. Sci., 66 (5): 581-584.
- SUTRA, L. e Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol., 40: 79-89.
- TAKEUCHI, S.; Maeda, T.; Hashimoto, N.; Imaizumi, K.; Caído, T. e Hayakawa, Y. (2001). Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. Vet Microbiol., 79: 267-274.
- TAPONEN, S.; Simojoki, H.; Haveri, M.; Larsen, H.D. e Pyörälä, S. (2005). Clinic characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 903.
- TARGOWSKI, S.P. (1983). Role of immune factors in protection of mammary gland. J. Dairy Sci., 66 (8): 1781-1789.
- TEUBER, M. e Geis, A. (2005). The Genus *Lactococcus*. The Prokaryotes, <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=433>. Consultado em Novembro, 2005.
- THRUSFIELD, M. (1999). Veterinary epidemiology (2^a edição). Ed: Blackwell Science Ltd. ISBN: 0-632-04851-4.

- TIETZE, M.; Majewski, T. e Szymanowska, A. (1993). Occurrence and prophylaxis of subclinical mastitis of sheep. *Proc. 5th Int. Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*, Budapest, Hungria, Maio de 1993: 121-126.
- TIZARD, I.R. (2004). Veterinary Immunology: an Introduction. (7^a edição). Ed: Saunders, an imprint of Elsevier. ISBN: 0-7216-0136-7
- TODAR, K. (2002). Antimicrobial agents used in treatment of infectious disease. De "Todar's Online Textbook of Bacteriology", University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/>. Consultado em Setembro, 2005.
- TOLLEFSON, L. e karp, B.E. (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Méd. Mal. Infect.*, 34(11): 514-21.
- TOMITA, G.M.; Nickerson, S.C.; Owens, W.E. e Wren, B. (1998). Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, 81 (8): 2159-2164.
- TOWBIN, H.; Staehelin, T. e Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (9): 4350-4354.
- TZORA, A. e Fthenakis, G.C. (1999). Mastitis associated with *Serratia marcescens* in dairy ewes. *Milking and milk production of dairy sheep and goats*. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 142-143.
- TZORA, A.; Fthenakis, G.C. e Linde, K. (1999). Naturally occurring or experimentally induced subclinical ovine mastitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Milking and milk production of dairy sheep and goats*. Ed: Barillet, F. e Zervas, N.P., EAAP publication N° 95, Wageningen Pers: 144-150.
- U.S. FDA (2001). Conventional Plate Count Method. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition Bacteriological Analytical Manual Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html#authors>. Consultado em Dezembro, 2005.
- VAN DER AUWERA, P.; Prinz, G. e Petrikos, G. (1991). Activity of intracellular antibiotics. *Infection*, 19 (Suppl. 4): S216-223.
- VAN WERVEN, T; Nijhof, C.; van Bussel, T. e Hogeveen, H. (2005). Use of on-farm testing of somatic cell count for selection of udder quarters for bacteriological culturing. *Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005*: 481-486.

- VANDAMME, P.; Holmes, B.; Coenye, T.; Goris, J.; Mahenthiralingam, E. ; LiPuma, J.J. e Govan, J.R.W. (2003). Burkholderia cenocepacia sp. nov. – a new twist to an old story. Res. Microbiol., 154: 91-96.
- VASI, J.; Frykberg, L.; Carlsson, L.E.; Lindberg, M. e Guss, B. (2000). M-like proteins of Streptococcus dysgalactiae. Infect. Immun., 68 (1): 294-302.
- VASUDEVAN, P.; Nair, M.K.M.; Annamalai, T. e Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. Vet. Microbiol., 92: 179-185.
- VILELA, C.L. (1993). Interaction of Pasteurella haemolytica with the ovine mammary gland. Tese de Doutorado. Universidade de Bristol, Reino Unido.
- Vitek 2 Compact 30 & 60 – Especificações técnicas (2005).
- VITKOV, M.; Peichevski, I.; Dimitrov, T. e Mikhailova, G. (1989). Changes in Composition of Milk from Sheep with Subclinical Mastitis. Veterinarna Sbirka, 87 (7): 50-53.
- VIVIER, E. e Malissen, B. 2005. Innate and adaptative immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. Nat. Immunol., 6 (1): 17-21.
- WALL, R.J.; Powell, A.M.; Paape, M.J.; Kerr, D.E.; Bannerman, D.D.; Pursel, V.G.; Wells, K.D.; Talbot, N. e Hawk, H.W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. Nature Biotech., 23: 445 – 451.
- WALLER, K.P. e Colditz, I.G. (1999). The effect of experimental infectious mastitis on leukocyte subpopulations and cytokine production in non-lactating ewes. J. Vet. Med. – Series B, 46 (5): 289-299.
- WALLMANN, J. (2006). Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. Int. J. Med. Microbil., 296 (S2): 81-86.
- WATKINS, G.H.; Burriel, A. R. e Jones J.E.T. (1991). A field investigation of subclinical mastitis in sheep in Southern England. Br. Vet. J., 147: 413-420.
- WATSON, D.L. (1988). Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. Res. Vet. Sci., 45 (1): 16-21.
- WATSON, D.L. (1989). Ovine opsonins for Staphylococcus aureus cell wall and pseudocapsule. Res. Vet. Sci., 46 (1): 84-89.
- WATSON, D.L. e Watson, N.A. (1989). Expression of a pseudocapsule by Staphylococcus aureus: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. Res. Vet. Sci., 47: 152-157.

- WATSON, D.L.; Franklin, N.A.; Davies, H.I.; Kettlewell, P. e Frost, A.J. (1990). Survey of intramammary infection in ewes on the New England Tableland of New South Wales. Aust. Vet. J., 67 (1): 6-8.
- WATTS, J.L.; Naidu, A.S. e Wadström, T. (1990). Collagen binding, elastase production and slime production associated with coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol., 28 (3): 580-583.
- WEBB, R.F. (1983). Clinical findings and pathological changes in *Histophilus ovis* infections of sheep. Res. Vet. Sci., 35 (1): 30-34.
- WEDLOCK, D.N.; Doolin, E.E.; Parlane, N.A. Lacy-Hulbert, S.J.; Woolford, M.W. e Buddle, B.M. (2000). Effects of yeast expressed recombinant interleukin-2 and interferon-gamma on physiological changes in bovine mammary glands and bactericidal activity of neutrophils. J. Dairy Res., 67 (2): 187-197.
- WEESE, (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 20: 601.
- WELLES, E.G.; Williams, M.A.; Tyler, J.W. e Lin, H.C. (1993). Hemostasis in cows with endotoxin-induced mastitis. Am. J. Vet. Res., 54 (8): 1230-1234.
- WENDORFF, B. (2002). Milk composition and cheese yield. Proceedings of the 8th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, 7-9 Nov., Cornell University, Ithaca, New York: 104-117.
- WHO (2000). World Health Organization. WHO global principals for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: report of a WHO consultation. http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSR_APH_2000.4.pdf. Consultado em Novembro, 2005.
- WIEDEMANN, B. e Grimm, H. (1996). Susceptibility to Antibiotics: Species Incidence and Trends. De "Antibiotics in Laboratory Medicine" (4^a edição). Ed: Victor Lorian, Williams & Wilkins, USA. ISBN: 0-683-05169-5.0.
- WINTER, P. e Baumgartner, W. (1998). Sensitivity of mastitis pathogens of ewes to antimicrobial drugs. Proceedings of the 6th International Symposium on the milking of small ruminants, Athens, Greece: 196-198.
- WINTER, P. e Colditz, I.G. (2002). Immunological responses of lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. Vet Immunol. Immunopathol., 89: 57-65.
- WINTER, P.; Schilcher, F.; Fuchs, K. e Colditz, I.G. (2003). Dynamics of experimentally induced *Staphylococcus epidermidis* mastitis in East Friesian milk ewes. J. Dairy Res., 70: 157:164.

- WINTER, P.; Schilcher, F.; Bago, Z.; Schoder, D.; Egerbacher, M.; Baumgartner, W. e Wagner, M. (2004). Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health, 51 (4): 176-179.
- WINTER, P.; Fuchs, K.; Schilcher, F. e Colditz, I.G. (2005). Host response reactions of the lactating ovine udder during experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 517-522.
- WOODWARD, W.D.; Besser, T.E.; Ward, A.C. e Corbeil, L.B. (1987). In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. Can. J. Vet. Res., 51 (1): 27-31.
- WOODWARD, W.D.; Ward, A.C.; Fox, L.K. e Corbeil, L.B. (1988). Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. Vet. Microbiol., 17 (4): 357-365.
- YANCEY, R.J.; Sanchez, M.S. e Ford, C.W. (1991). Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10 (2): 107-113.
- YARWOOD, J.M.; McCormick, J.K.; Paustian, M.L.; Orwin, P.M.; Kapur, V. e Schlievert, P.M. (2002). Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J. Biol. Chem., 277: 13138-13147.
- ZAVIZION, B.; White, J.H. e Bramley, A.J. (1997). *Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells. J. Inf. Dis., 176: 1637-1640.
- ZECCONI, A e Hamann, J. (2005). Machine effects on teat tissue defence mechanisms measured in teat secretion. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 843.
- ZECCONI, A.; Cesaris, L.; Liandris, E.; Daprà, V. e Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microb. Pathog., 40: 177-183.
- ZELJKO, P.; Tomaskovic, A.; Tofant, A.; Balenovic, T.; Cergolj, M. e Prvanovic, N. (2005). Significance of udder sanitation on total number of bacteria at teats and milk of ewes. Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, Maastricht, The Netherlands, June 2005: 932.

- ZHANG, S. e Maddox, C.W. (2000). Cytotoxic activity of coagulase-negative *Staphylococci* in bovine mastitis. Infect. Immun., 68 (3): 1102-1108.
- ZILUAGA, D.I.; Romeo, M. e Marco, J.C. (1998). Prevalencia, patogenicidad y epidemiología de los microorganismos implicados em procesos mamílicos del ganado ovino. Ovis, 59: 27-49.
- ZSCHÖCK, M.; Botzler, D.; Blöcher, S.; Sommerhäuser, J. e Hamann, H.P. (2000). Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. International Dairy J., 10: 569-574.

ANEXOS

Anexo 1 –TABELAS ANEXAS

Tabela I: Relação entre os resultados do TCM e respectivos resultados das análises bacteriológicas nos diferentes efectivos

Ef	TCM-pos	V	Análises		+	Análises		++	Análises		+++	Análises	
			pos	neg		pos	neg		pos	neg		pos	neg
1	25	0	0	0	1	1	0	8	6	2	16	14	2
2	30	0	0	0	2	1	1	9	7	2	19	14	5
3	28	2	0	2	7	6	1	5	4	1	14	13	1
4	68	1	0	1	21	17	4	21	13	8	25	23	2
5	6	0	0	0	4	3	1	0	0	0	2	2	0
6	10	2	2	0	4	3	1	2	2	0	2	2	0
7	3	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
8	2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
9	17	5	2	3	7	6	1	5	5	0	0	0	0
10	4	0	0	0	2	2	0	2	2	0	0	0	0
11	19	0	0	0	8	5	3	10	5	5	1	1	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	31	4	2	2	7	6	1	11	11	0	9	9	0
14	35	6	3	3	6	5	1	11	6	5	12	10	2
15	36	4	4	0	7	7	0	11	11	0	14	14	0
16	40	7	1	6	6	5	1	14	6	8	13	6	7
17	36	21	16	5	8	8	0	5	5	0	2	2	0
18	23	11	3	8	5	4	1	2	0	2	5	5	0
Tot	413	64	34	30	97	80	17	118	85	33	134	115	19

Tabela IV: Bactérias isoladas de amostras de leite de animais com MSC nos diferentes efectivos

Bactérias	Efectivo																							TOTAL	%(total)	%(SCN)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18								
SCN	19	20	18	52	7	11	2	1	7	4	4	11	0	11	9	17	22	13	26	8	249	70,14	100			
<i>Staph. epidermidis</i>	17	15	8	8	3	7															108	30,42	43,37			
<i>Staph. xylosum</i>		2	4	22	3		3				5	4	1		4	7	5	5	6	4	58	16,34	23,29			
<i>Staph. hyicus</i>	1	1	1	13	2		1	1	1					1	1						23	6,48	9,24			
<i>Staph. simulans</i>		2	4	5			1	1	1					4	3					1	23	6,48	9,24			
<i>Staph. chromogenes</i>			1	4							1				4						10	2,82	4,02			
<i>Staph. warneri</i>					1						1					2				2	6	1,69	2,41			
<i>Staph. lentus</i>	1																		5		6	1,69	2,41			
<i>Staph. capitis</i>														1	1				2		4	1,13	1,61			
<i>Staph. sciuri</i>																			3		3	0,85	1,20			
<i>Staph. cohnii</i>														2							2	0,56	0,80			
<i>Staph. hominis</i>											1					1					2	0,56	0,80			
<i>Staph. caprae</i>																					2	0,56	0,80			
<i>Staph. sp.</i>					1															1	2	0,56	0,80			
<i>Staph. aureus</i>	2			4				1						4	6	1	2	2			22	6,20				
<i>Staph. intermedius</i>														1							1	0,28				
<i>Micrococcus luteus</i>																					1	0,28				
<i>Strept. agalactiae</i>	1													12	2						15	4,23				
<i>Strept. equinus (bovis)</i>	1		1					1													3	0,85				
<i>Strept. acidominimus</i>											1										2	0,56				
<i>Strept. zoepidemicus</i>									1												1	0,28				
<i>Strept. mitis</i>																					1	0,28				
<i>Strept. suis</i>																					1	0,28				
<i>Strept. sp.</i>																			1		1	0,28				
<i>Enteroc. faecalis</i>																					1	0,28				
<i>Enteroc. faecium</i>		1																			12	3,38				
<i>Enteroc. durans</i>																	2				2	0,56				
<i>Aerococcus viridans</i>																1					2	0,56				
<i>Lactococcus lactis</i>																2	2				5	1,41				
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>														1	1						2	0,56				
<i>C. jejuni</i>																					2	0,56				
<i>C. glucorolyticum</i>																					5	1,41				
<i>C. accolens</i>																					6	1,69				
<i>C. striatum-amycolatum (gr.F2)</i>																					1	0,28				
<i>Corynebacterium. sp.</i>		1																			2	0,56				
<i>Pseud. aeruginosa</i>		1																			4	1,13				
<i>Mannheimia haemolytica</i>																					8	2,25				
<i>Pasteurella multocida</i>																					1	0,28				
<i>Escherichia coli</i>																					1	0,28				
<i>Serratia marcescens</i>																					2	0,56				
<i>Enterobacter. sp.</i>																					2	0,56				
Total de agentes isolados/Ef.	23	23	25	56	7	11	3	3	12	4	4	12	0	30	26	44	18	45	13	355	100,00					

Tabela V: Bactérias isoladas em cultura mista de amostras de leite de animais com MSC nos diferentes efectivos

Associações bacterianas	Efectivo																		Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. xylosum</i>															1				1
<i>Staph. aureus</i> + <i>Staph. chromogenes</i>															1				1
<i>Staph. aureus</i> + <i>Strept. equinus (bovis)</i>	1							1											2
<i>Staph. aureus</i> + <i>C. gluc-sem.</i>																	1		1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. xylosum</i>		1		1		2									1				5
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. hyicus</i>												1							1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. simulans</i>															1				1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. warneri</i>				1															1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. lentus</i>	1																1		2
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Staph. capitis</i>																			1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Strept. acidominimus</i>									1										1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Strept. mitis</i>													1						1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>Enteroc. faecalis</i>																1			1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>E. coli</i>																			1
<i>Staph. epidermidis</i> + <i>C. jeikeium</i>																			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. hyicus</i>				2															2
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. chromogenes</i>															1				1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. warneri</i>																1			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. cohnii</i>														1					1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. hominis</i> + <i>C. sp.</i>																1			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. caprae</i>																		1	1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Staph. sp.</i>																			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Strept. sp.</i>																			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>C. gluc</i>																		1	1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>C. accolens</i>																			1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Corynebacterium. sp.</i>															1				1
<i>Staph. xylosum</i> + <i>Serratia marcescens</i>															1				1
<i>Staph. hyicus</i> + <i>Staph. simulans</i>			1																1
<i>Staph. hyicus</i> + <i>Staph. sp.</i>					1														1
<i>Staph. simulans</i> + <i>Strept. acidominimus</i>							1												1
<i>Staph. lentus</i> + <i>Staph. sciuri</i>																	1		1
<i>Staph. lentus</i> + <i>C. jeik. + C. gluc</i>																		1	1
<i>Staph. sciuri</i> + <i>Aeroc. viridans</i> + <i>C. gluc</i>																		1	1
<i>Enteroc. faecalis</i> + <i>Aerococcus viridans</i>																1			1
<i>C. gluc. + C. striat/amyc.</i>																		1	1
Total de infecções mistas / Efectivo	2	1	1	3	2	2	1	1	0	0	1	0	1	2	8	3	13	1	42

Tabela VI: Efectivo, animal, glândula, reacção ao TCM e respectivo microrganismo isolado

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
1	1	D	N	N
1	2	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	3	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	3	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	4	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	5	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	5	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
1	6	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
1	6	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	7	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	7	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	8	D	3+	N
1	8	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
1	9	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
1	9	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
1	10	D	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. lentus</i>
1	10	E	3+	N
1	11	D	MC	<i>S. aureus</i> + <i>Strep. dysgalactiae</i>
1	11	E	MC	<i>S. lentus</i>
1	12	D	MC	<i>Strep. agalactiae</i> + <i>Strep. adjacens</i>
1	12	E	MC	<i>S. epidermidis</i> + <i>Strep. equinus (bovis)</i>
1	13	D	MC	N
1	13	E	MC	N
1	14	D	2+	N
1	14	E	2+	N
1	15	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
1	15	E	2+	<i>Strep. agalactiae</i>
1	16	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	16	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
1	17	E	MC	<i>S. epidermidis</i>
1	18	D	MC	<i>S. epidermidis</i>
1	19	E	3+	<i>S. hyicus</i>
1	20	E	MC	<i>S. epidermidis</i>
1	21	D	3+	<i>S. aureus</i>
1	22	E	3+	<i>S. aureus</i> + <i>Strep. equinus (bovis)</i>
1	23	?	MC	N
1	24	?	MC	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
2	25	D	1+	N
2	25	E	2+	N
2	26	D	MC	<i>Proteus sp.</i>
2	26	E	3+	<i>Coryn. sp.</i>
2	27	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	27	E	2+	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	28	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	28	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	29	D	MC	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
2	29	E	3+	<i>S. hyicus</i>
2	30	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	30	E	MC	<i>S. aureus</i>
2	31	D	3+	<i>S. epidermidis</i>

Tabelas anexas

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
2	31	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	32	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	32	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	33	D	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. xylosus</i>
2	33	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	34	D	3+	N
2	34	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	35	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	35	E	3+	<i>S. simulans</i>
2	36	D	3+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	36	E	2+	N
2	37	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	37	E	1+	<i>S. simulans</i>
2	38	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
2	38	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
2	39	E	3+	N
2	40	D	3+	N
2	41	D	3+	<i>S. xylosus</i>
2	42	D	3+	N
2	43	D	3+	N
2	44	E	MC	N
2	45	E	MC	<i>S. simulans</i>
2	46	D	MC	<i>S. aureus</i>
3	47	E	2+	<i>S. chromogenes</i>
3	48	D	2+	<i>S. xylosus</i>
3	49	D	MC	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
3	50	D	3+	<i>S. simulans</i>
3	51	E	3+	N
3	52	E	3+	<i>S. xylosus</i>
3	53	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
3	54	D	3+	<i>Mannheimia haemolytica</i>
3	55	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
3	55	E	3+	<i>S. simulans</i>
3	56	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
3	57	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
3	57	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
3	58	D	3+	<i>S. xylosus</i>
3	58	E	2+	<i>S. xylosus</i>
3	59	E	1+	<i>Strep. equinus (bovis)</i>
3	60	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
3	61	D	2+	N
3	62	D	3+	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
3	63	D	3+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	64	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
3	65	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
3	66	D	3+	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
3	67	E	3+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	68	E	2+	<i>S. simulans</i>
3	69	D	1+	N
3	70	D	V	N
3	70	E	V	N
3	71	D	1+	<i>S. hyicus</i> + <i>S. simulans</i>
4	72	D	1+	<i>S. xylosus</i>

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
4	72	E	2+	N
4	73	D	1+	<i>S. hyicus</i>
4	74	D	3+	<i>S. hyicus</i>
4	74	E	3+	<i>S. chromogenes</i>
4	75	D	1+	N
4	76	E	1+	<i>S. hyicus</i>
4	77	D	2+	<i>S. hyicus</i>
4	78	D	3+	<i>S. xylosus</i> + <i>S. hyicus</i>
4	78	E	3+	<i>S. hyicus</i>
4	79	D	2+	<i>S. xylosus</i> + <i>S. hyicus</i>
4	80	D	2+	N
4	80	E	2+	N
4	81	D	3+	<i>S. xylosus</i>
4	81	E	2+	N
4	82	D	1+	<i>S. xylosus</i>
4	83	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
4	84	D	1+	<i>S. xylosus</i>
4	85	E	1+	<i>S. hyicus</i>
4	86	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
4	87	D	1+	<i>S. simulans</i>
4	87	E	1+	<i>S. hyicus</i>
4	88	D	1+	N
4	88	E	1+	<i>S. simulans</i>
4	89	E	2+	<i>S. xylosus</i>
4	90	D	2+	<i>S. xylosus</i>
4	90	E	1+	<i>S. xylosus</i>
4	91	D	1+	N
4	91	E	2+	<i>S. xylosus</i>
4	92	D	1+	<i>S. hyicus</i>
4	93	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
4	93	E	2+	N
4	94	D	2+	<i>S. hyicus</i>
4	94	E	3+	<i>S. chromogenes</i>
4	95	D	2+	<i>S. xylosus</i>
4	96	E	1+	<i>S. xylosus</i>
4	97	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
4	97	E	3+	<i>S. hyicus</i>
4	98	D	2+	<i>S. simulans</i>
4	98	E	2+	<i>S. xylosus</i>
4	99	D	2+	<i>S. xylosus</i>
4	100	E	2+	N
4	101	D	2+	<i>S. warneri</i>
4	102	E	1+	<i>S. xylosus</i>
4	103	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
4	104	D	1+	<i>S. xylosus</i>
4	104	E	1+	<i>S. xylosus</i>
4	105	D	3+	<i>S. simulans</i>
4	105	E	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. xylosus</i>
4	106	E	1+	N
4	107	D	3+	<i>S. chromogenes</i>
4	107	E	2+	N
4	108	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
4	109	E	3+	<i>S. xylosus</i>

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
4	110	E	3+	<i>S. aureus</i>
4	111	D	3+	<i>S. xylosus</i>
4	112	E	3+	<i>S. simulans</i>
4	113	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
4	114	D	3+	<i>S. aureus</i>
4	115	E	3+	<i>S. chromogenes</i>
4	116	E	3+	N
4	117	D	3+	<i>S. aureus</i>
4	118	E	3+	<i>S. hyicus</i>
4	119	D	3+	<i>S. xylosus</i>
4	120	D	3+	N
4	120	E	2+	N
4	121	E	3+	<i>S. xylosus</i>
4	122	E	V	N
5	123	D	1+	N
5	123	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
5	124	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
5	125	E	1+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. warneri</i>
5	126	D	1+	<i>S. hyicus</i> + <i>S. sp.</i>
5	127	D	3+	<i>S. hyicus</i>
6	135	E	2+	<i>S. xylosus</i>
6	136	E	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. xylosus</i>
6	137	D	V	<i>S. epidermidis</i>
6	138	D	V	<i>S. epidermidis</i>
6	139	E	1+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. xylosus</i>
6	140	D	MC	<i>S. epidermidis</i>
6	140	E	MC	<i>S. epidermidis</i>
6	141	D	2+	<i>S. caprae</i>
6	142	D	1+	N
6	142	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
6	143	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
6	144	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
7	145	E	2+	<i>S. hyicus</i>
7	146	D	1+	N
7	147	E	V	<i>S. simulans</i> + <i>Strep. acidominimus</i>
8	148	E	2+	<i>S. simulans</i>
8	149	D	1+	<i>S. aureus</i> + <i>Strep. equinus (bovis)</i>
9	150	E	2+	<i>Pasteurella multocida</i>
9	151	D	1+	<i>Strep. zooepidemicus</i>
9	151	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
9	152	E	MC	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>
9	153	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
9	154	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
9	154	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
9	155	D	V	<i>S. hyicus</i>
9	155	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
9	156	D	1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	156	E	2+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	157	D	2+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	158	E	2+	<i>S. simulans</i>
9	159	D	V	N
9	159	E	V	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	160	D	V	N

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
9	161	D	V	N
9	162	D	1+	N
10	163	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
10	164	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
10	165	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
10	166	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
11	167	D	2+	<i>S. simulans</i>
11	168	E	1+	N
11	169	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
11	170	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
11	171	E	1+	<i>S. warneri</i>
11	172	E	2+	N
11	173	D	1+	<i>S. hyicus</i>
11	174	E	2+	<i>S. hominis</i>
11	175	D	2+	N
11	176	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
11	177	E	2+	<i>S. epidermidis</i> + <i>Strep. acidominimus</i>
11	178	E	2+	N
11	179	D	2+	<i>S. chromogenes</i>
11	180	E	MC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11	181	D	1+	<i>S. xylosum</i>
11	182	D	2+	N
11	182	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
11	183	D	1+	N
11	184	D	2+	N
11	184	E	1+	N
11	185	D	MC	<i>S. aureus</i> + <i>S. hyicus</i>
11	185	E	MC	<i>Strep. sp.</i>
13	186	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
13	186	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
13	187	D	V	<i>Enterococcus faecalis</i>
13	187	E	1+	<i>Enterococcus faecalis</i>
13	188	D	V	N
13	188	E	V	N
13	189	E	2+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	190	D	MC	<i>Strep. agalactiae</i>
13	190	E	2+	<i>S. aureus</i>
13	191	D	1+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	191	E	2+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	192	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
13	192	E	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. hyicus</i>
13	193	D	1+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	194	D	2+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	194	E	2+	<i>Lactococcus lactis</i>
13	195	E	2+	<i>S. aureus</i>
13	196	E	2+	<i>S. aureus</i>
13	197	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
13	197	E	1+	N
13	198	D	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	198	E	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	199	D	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	200	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
13	201	E	3+	<i>S. aureus</i>

Tabelas anexas

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
13	202	D	1+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	203	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
13	203	E	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	204	D	2+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. capitis</i>
13	204	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
13	205	D	V	<i>Strep. agalactiae</i>
13	206	D	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
13	206	E	MC	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> + <i>S. xylosus</i>
14	207	D	3+	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
14	207	E	3+	<i>Strep. agalactiae</i>
14	208	D	V	N
14	209	D	V	N
14	209	E	V	N
14	210	E	2+	<i>S. xylosus</i>
14	211	D	V	<i>Enterobacter sp.</i>
14	211	E	1+	<i>S. xylosus</i>
14	212	D	2+	N
14	212	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
14	213	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
14	214	D	3+	N
14	214	E	2+	N
14	215	D	2+	<i>S. simulans</i>
14	216	E	3+	N
14	217	D	3+	<i>S. intermedius</i>
14	218	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
14	219	D	1+	<i>S. simulans</i>
14	220	E	3+	<i>S. simulans</i>
14	221	D	1+	<i>S. capitis</i>
14	222	D	3+	<i>Aerococcus viridans</i>
14	222	E	3+	<i>S. epidermidis</i> + <i>Strep. mitis</i>
14	223	E	2+	<i>S. xylosus</i>
14	224	D	1+	<i>S. cohnii</i>
14	224	E	1+	<i>Coryn. sp.</i>
14	225	D	3+	<i>Aerococcus viridans</i>
14	226	D	V	<i>S. xylosus</i> + <i>S. cohnii</i>
14	227	E	V	<i>S. hyicus</i>
14	228	E	3+	<i>S. simulans</i>
14	229	D	2+	N
14	229	E	2+	<i>Strep. agalactiae</i>
14	230	D	2+	N
14	231	E	1+	N
14	232	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
14	233	D	2+	N
15	268	D	1+	<i>S. aureus</i> + <i>S. xylosus</i>
15	268	E	1+	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	269	D	3+	<i>Serratia marcescens</i>
15	269	E	3+	<i>Serratia marcescens</i> + <i>S. xylosus</i>
15	270	D	2+	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	270	E	3+	<i>S. aureus</i> + <i>S. chromogenes</i>
15	271	D	2+	<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Aerococcus viridans</i>
15	271	E	2+	<i>S. aureus</i>
15	272	D	3+	<i>Aerococcus viridans</i>
15	272	E	3+	<i>S. chromogenes</i>

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
15	273	E	3+	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	274	E	1+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. simulans</i>
15	275	E	2+	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	276	D	V	<i>S. xyloso</i>
15	276	E	2+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15	277	D	1+	<i>S. xyloso</i> + <i>Coryn. sp.</i>
15	278	D	1+	<i>S. epidermidis</i>
15	279	E	V	<i>S. xyloso</i>
15	280	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
15	280	E	2+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. xyloso</i>
15	281	E	2+	<i>S. simulans</i>
15	282	D	3+	<i>Escherichia coli</i>
15	282	E	1+	<i>Enterococcus durans</i>
15	283	D	V	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	284	D	1+	<i>S. simulans</i>
15	284	E	V	<i>S. epidermidis</i>
15	285	D	3+	<i>S. aureus</i>
15	285	E	2+	<i>Enterococcus faecalis</i>
15	286	D	3+	<i>S. aureus</i>
15	287	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
15	287	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
15	288	E	2+	<i>S. chromogenes</i>
15	289	D	3+	<i>S. xyloso</i> + <i>S. chromogenes</i>
15	289	E	3+	<i>S. epidermidis</i>
15	290	D	3+	<i>S. aureus</i>
15	290	E	3+	<i>Enterococcus faecalis</i>
16	291	D	1+	N
16	291	E	1+	N
16	292	E	1+	N
16	293	D	2+	N
16	293	E	3+	N
16	294	D	3+	<i>Enterococcus faecium</i>
16	294	E	2+	N
16	295	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
16	295	E	2+	N
16	296	D	3+	<i>S. aureus</i>
16	296	E	3+	N
16	297	D	3+	N
16	297	E	3+	N
16	298	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
16	299	D	3+	<i>S. xyloso</i>
16	299	E	2+	N
16	300	D	2+	<i>S. epidermidis</i>
16	300	E	1+	<i>Coryn. jeikeium</i>
16	301	D	2+	<i>S. epidermidis</i> + <i>Enterococcus faecium</i>
16	302	D	V	N
16	302	E	V	N
16	303	D	2+	N
16	303	E	2+	N
16	304	D	3+	<i>S. epidermidis</i>
16	305	D	V	N
16	305	E	V	N
16	306	D	V	N

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
16	306	E	2+	<i>S. xylosus</i> + <i>S. warneri</i>
16	307	D	3+	N
16	308	E	1+	N
16	309	D	1+	N
16	309	E	2+	<i>S. xylosus</i>
16	310	D	3+	N
16	310	E	2+	N
16	311	D	V	<i>S. xylosus</i> + <i>S. hominis</i> + <i>Coryneb. sp</i>
16	311	E	V	N
16	312	D	3+	<i>S. xylosus</i>
16	312	E	2+	N
16	313	E	2+	<i>S. warneri</i>
16	314	D	3+	N
16	314	E	MC	N
17	315	D	V	<i>S. epidermidis</i>
17	315	E	V	<i>S. epidermidis</i>
17	316	D	2+	<i>Enterococcus durans</i>
17	317	E	3+	<i>S. xylosus</i> + <i>Strep. sp.</i>
17	318	D	2+	<i>Coryn. glucoronolyticum</i> + <i>bacilo -</i>
17	318	E	1+	<i>S. sciuri</i> + <i>Coryn. gluc.</i> + <i>Aeroc. vir.</i>
17	319	D	V	N
17	319	E	V	N
17	320	E	1+	<i>S. epidermidis</i>
17	321	D	1+	<i>S. xylosus</i>
17	321	E	V	N
17	322	D	V	<i>S. capitis</i>
17	323	D	V	<i>S. epidermidis</i>
17	323	E	V	<i>S. xylosus</i> + <i>Coryn. accolens</i>
17	324	E	2+	<i>S. epidermidis</i> + <i>Escherichia coli</i>
17	325	E	2+	<i>bacilos -</i>
17	326	E	V	<i>S. xylosus</i>
17	327	D	V	<i>S. lentus</i>
17	327	E	V	<i>S. lentus</i> + <i>S. sciuri</i>
17	328	D	1+	<i>Coryn. striatum-amycolatum (gr.F2)</i>
17	328	E	1+	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. lentus</i>
17	329	D	1+	<i>S. lentus</i>
17	329	E	V	<i>S. lentus</i> + <i>Ccoryn. jeik.</i> + <i>Coryn. gluc.</i>
17	330	D	V	<i>Coryn. jeikeium</i>
17	330	E	V	<i>S. epidermidis</i> + <i>Coryn. jeikeium</i>
17	331	D	V	<i>Coryn. jeikeium</i>
17	332	D	V	<i>S. xylosus</i> + <i>Coryn. gluc.</i>
17	332	E	V	<i>Coryn. gluc.</i> + <i>Coryn. striat/amyc.</i>
17	333	D	V	N
17	334	D	1+	<i>S. xylosus</i> + <i>S. sp</i>
17	334	E	V	N
17	335	E	3+	<i>S. aureus</i>
17	336	D	1+	<i>S. sciuri</i>
17	336	E	V	<i>S. aureus</i> + <i>Coryn. gluc.</i>
17	337	D	V	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. capitis</i>
17	337	E	2+	<i>S. epidermidis</i>
18	338	D	3+	<i>Strep. suis</i>
18	339	D	1+	<i>S. xylosus</i>
18	340	D	3+	<i>S. simulans</i>

Efectivo	Análise nº	Glândula	TCM	Microrganismo(s) isolado(s)
18	341	D	2+	N
18	341	E	2+	N
18	342	E	3+	<i>S. warneri</i>
18	343	D	1+	<i>S. xylosus</i>
18	344	D	V	N
18	345	D	V	<i>S. xylosus</i>
18	345	E	V	<i>S. xylosus</i> + <i>S. caprae</i>
18	346	D	V	N
18	346	E	V	N
18	347	D	V	N
18	348	E	V	N
18	349	D	3+	<i>S. aureus</i>
18	350	D	1+	N
18	350	E	V	<i>S. warneri</i>
18	351	D	V	N
18	351	E	1+	<i>Enterococcus faecalis</i>
18	352	E	V	N
18	353	D	1+	<i>Micrococcus luteus</i>
18	354	D	3+	<i>S. aureus</i>
18	354	E	V	N

Tabela VII: Relação entre a reacção ao TCM/MC e o microrganismo responsável

An. Bacteriológica	Total	S	%	1+	%	2+	%	3+	%	MC	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96	6	6,25	22	22,92	27	28,13	36	37,50	5	5,21
<i>Staph. xylosus</i>	39	4	10,26	13	33,33	12	30,77	10	25,64		
<i>Staph. hyicus</i>	18	2	11,11	6	33,33	3	16,67	7	38,89		
<i>Staph. simulans</i>	21			5	23,81	7	33,33	8	38,10	1	4,76
<i>Staph. chromogenes</i>	8					3	37,50	5	62,50		
<i>Staph. warneri</i>	5	1	20,00	1	20,00	2	40,00	1	20,00		
<i>Staph. lentus</i>	3	1	33,33	1	33,33					1	33,33
<i>Staph. capitis</i>	2	1	50,00	1	50,00						
<i>Staph. sciuri</i>	1			1	100						
<i>Staph. cohnii</i>	1			1	100						
<i>Staph. hominis</i>	1					1	100				
<i>Staph. caprae</i>	1					1	100				
SCN (cult. pura)	196	15	7,65	51	26,02	56	28,57	67	34,18	7	3,57
cultura mista de SCN+SCN	23	5		7		4		7			
cultura mista de SCN+ <i>Strep.</i>	5	1				1		2		1	
cultura mista de SCN+ <i>Coryn.</i>	6	4		2							
<i>Staph. aureus</i> (cult. pura)	18					4	22,22	12	66,67	2	11,11
<i>Staph. aureus</i> (cult. mista)	8	1	12,50	2	25,00			2	25,00	3	37,50
<i>Staph. aureus</i> (total)	26	1	3,85	2	7,69	4	15,38	14	53,85	5	19,23
<i>Staph. intermedius</i>	1							1	100		
<i>Micrococcus luteus</i>	1			1	100						
<i>Streptococcus agalactiae</i> (pura)	16	1	6,25	3	18,75	5	31,25	6	37,50	1	6,25
<i>Strep. agalactiae</i> (total)	17	1	5,88	3	17,65	5	29,41	6	35,29	2	11,76
<i>Strep. dysgalactiae</i>	1									1	
<i>Strep. equinus</i> (bovis)	3			2				1			
<i>Strep. acidominimus</i>	2	1				1					
<i>Strep. zooepidemicus</i>	1			1							
<i>Strep. mitis</i>	1							1			
<i>Strep. suis</i>	1							1			
<i>Strep. sp.</i>	2							1		1	
<i>Streptococci</i> (total)	28	2	7,14	6	21,43	6	21,43	10	35,71	4	14,29
<i>Enterococcus spp.</i> (cult. pura)	14	2	14,29	4	28,57	5	35,71	3	21,43		
<i>Enteroc. spp.</i> (total)	16	2	12,50	4	25,00	7	43,75	3	18,75		
<i>Aerococcus viridans</i> (cult. pura)	3							3	100		
<i>Aeroc. viridans</i> (total)	5			1	20,00	1	20,00	3	60,00		
<i>Lactococcus lactis</i>	2					1	50,00	1	50,00		
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (puro)	5							2	40,00	3	60,00
<i>A. pyogenes</i> (total)	7							3	42,86	4	57,14
<i>C. glucoronolyticum</i>	6	3		2		1					
<i>C. jeikeium</i>	5	4		1							
<i>C. accolens</i>	1	1									
<i>Corynebacterium gr.F2</i>	2	1		1							
<i>Corynebacterium sp.</i>	4	1		2				1			
<i>Corynebacterium</i> (cult. pura)	7	1		4				1			
<i>Corynebacterium</i> (cult. mista)	11	9		2							
<i>Corynebacterium</i> (total)	18	10	55,56	6	33,33	1	5,56	1	5,56		
<i>Pseudom. aeruginosa</i>	9	1	11,11	1	11,11	3	33,33	3	33,33	1	11,11
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1							1	100		
<i>Pasteurella multocida</i>	1					1	100				
<i>Escherichia coli</i>	1							1	100		
<i>Proteus sp.</i>	1									1	100
<i>Serratia marcescens</i>	2							2	100		
<i>Enterobacter sp.</i>	1	1	100								

Tabela VIII: Resultados das leituras do método quantitativo para a produção de biofilme

Isolado		Dia 1						Dia 2						Dia 3					
		DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cot N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor
2	D	0,066	0,083	0,064	0,071	0,222	-0,15	0,05	0,088	0,043	0,047	0,283	-0,237	0,1392	0,1367	0,1609	0,1456	0,247	-0,101
3	D	0,073	0,056	0,093	0,074	0,222	-0,15	0,065	0,06	0,074	0,066	0,283	-0,217	0,16	0,1555	0,0811	0,158	0,247	-0,089
3	E	0,103	0,137	0,089	0,110	0,222	-0,11	0,101	0,065	0,067	0,066	0,283	-0,217	0,0999	0,0796	0,0874	0,089	0,247	-0,158
4	D	0,065	0,062	0,066	0,064	0,222	-0,16	0,072	0,119	0,079	0,090	0,283	-0,193	0,0761	0,0754	0,068	0,073	0,247	-0,174
5	D	0,19	0,158	0,177	0,175	0,222	-0,05	0,114	0,072	0,07	0,085	0,283	-0,198	0,089	0,112	0,113	0,105	0,222	-0,117
6	D	0,055	0,061	0,063	0,060	0,222	-0,16	0,086	0,066	0,064	0,072	0,283	-0,211	0,0637	0,0648	0,0803	0,070	0,575	-0,505
6	E	0,071	0,059	0,082	0,071	0,222	-0,15	0,049	0,064	0,098	0,057	0,283	-0,227	0,0875	0,1272	0,0833	0,085	0,247	-0,162
7	D	0,059	0,052	0,064	0,058	0,222	-0,16	0,052	0,049	0,167	0,051	0,283	-0,233	0,0689	0,0674	0,0787	0,072	0,247	-0,175
7	E	0,091	0,08	0,066	0,079	0,222	-0,14	0,15	0,049	0,081	0,116	0,283	-0,168	0,1251	0,074	0,1176	0,106	0,247	-0,141
8	E	0,063	0,08	0,082	0,075	0,222	-0,15	0,092	0,131	0,058	0,112	0,283	-0,172	0,0788	0,0736	0,0944	0,082	0,247	-0,165
9	D	0,064	0,061	0,044	0,056	0,222	-0,17	0,06	0,046	0,046	0,051	0,283	-0,232	0,0953	0,1037	0,0932	0,097	0,575	-0,478
9	E	0,073	0,074	0,077	0,075	0,222	-0,15	0,057	0,051	0,075	0,061	0,283	-0,222	0,1023	0,0997	0,0832	0,095	0,247	-0,152
10	D1	0,092	0,081	0,071	0,081	0,222	-0,14	0,049	0,074	0,06	0,061	0,283	-0,222	0,0972	0,0893	0,0931	0,093	0,247	-0,154
12	E1	0,058	0,115	0,094	0,105	0,222	-0,12	0,14	0,159	0,07	0,150	0,283	-0,134	0,0842	0,08	0,0758	0,080	0,247	-0,167
15	D	0,057	0,055	0,109	0,056	0,222	-0,17	0,041	0,049	0,047	0,046	0,283	-0,237	0,1019	0,1055	0,1099	0,106	0,247	-0,141
16	D	0,061	0,056	0,06	0,059	0,222	-0,16	0,046	0,043	0,048	0,046	0,283	-0,237	0,0831	0,0998	0,1023	0,095	0,247	-0,152
16	E	0,043	0,046	0,045	0,045	0,222	-0,18	0,049	0,048	0,055	0,051	0,283	-0,232	0,0796	0,0699	0,0854	0,078	0,247	-0,169
17	E	0,05	0,044	0,054	0,049	0,222	-0,17	0,072	0,059	0,047	0,059	0,283	-0,224	0,0888	0,0774	0,0839	0,083	0,247	-0,164
18	D	0,053	0,053	0,073	0,060	0,222	-0,16	0,049	0,045	0,044	0,046	0,283	-0,237	0,0806	0,0858	0,0769	0,081	0,575	-0,494
20	E	0,059	0,069	0,057	0,062	0,222	-0,16	0,062	0,053	0,124	0,058	0,283	-0,226	0,0952	0,0847	0,1276	0,103	0,247	-0,145
27	D	0,057	0,059	0,084	0,067	0,222	-0,16	0,055	0,057	0,059	0,057	0,283	-0,226	0,1095	0,1397	0,1014	0,117	0,247	-0,130
28	D	0,061	0,064	0,054	0,060	0,222	-0,16	0,059	0,051	0,068	0,059	0,283	-0,224	0,097	0,1065	0,0885	0,097	0,247	-0,150
28	E	0,057	0,053	0,062	0,057	0,222	-0,16	0,072	0,08	0,057	0,070	0,283	-0,213	0,1929	0,1332	0,1313	0,152	0,247	-0,095
30	D	0,052	0,061	0,059	0,057	0,222	-0,16	0,1	0,069	0,121	0,111	0,283	-0,173	0,1642	0,1177	0,0729	0,141	0,247	-0,106
31	D	0,092	0,083	0,054	0,088	0,222	-0,13	0,052	0,057	0,053	0,054	0,283	-0,229	0,0813	0,138	0,0749	0,078	0,247	-0,169
31	E	0,061	0,064	0,063	0,063	0,222	-0,16	0,045	0,044	0,045	0,045	0,283	-0,238	0,0683	0,0665	0,0854	0,073	0,247	-0,174
32	D	0,06	0,056	0,049	0,055	0,222	-0,17	0,057	0,053	0,058	0,056	0,283	-0,227	0,1072	0,1303	0,0955	0,111	0,247	-0,136
32	E	0,053	0,05	0,065	0,056	0,222	-0,17	0,052	0,055	0,047	0,051	0,283	-0,232	0,1076	0,0634	0,0686	0,080	0,247	-0,167
33	D2	0,066	0,068	0,068	0,067	0,222	-0,15	0,062	0,099	0,068	0,076	0,283	-0,207	0,16	0,1343	0,136	0,143	0,575	-0,432
33	E	0,055	0,075	0,093	0,074	0,168	-0,09	0,071	0,071	0,052	0,065	0,257	-0,192	0,0748	0,0757	0,1275	0,093	0,575	-0,482
34	E	0,069	0,059	0,053	0,060	0,168	-0,11	0,049	0,056	0,064	0,056	0,257	-0,201	0,0695	0,0745	0,0725	0,072	0,247	-0,175
37	D	0,112	0,082	0,057	0,070	0,168	-0,10	0,066	0,105	0,148	0,127	0,257	-0,131	0,1433	0,1725	0,1548	0,157	0,575	-0,418
38	E	0,053	0,104	0,078	0,066	0,168	-0,10	0,061	0,081	0,077	0,073	0,257	-0,184	0,0778	0,0795	0,0662	0,075	0,247	-0,173
53	D	0,065	0,083	0,116	0,074	0,168	-0,09					0,257	-0,257	0,1527	0,1472	0,1163	0,139	0,575	-0,436
86	D	0,081	0,072	0,077	0,077	0,168	-0,09					0,257	-0,257	0,1454	0,0762	0,0796	0,078	0,218	-0,140
93	D	0,071	0,096	0,09	0,086	0,168	-0,08	0,048	0,049	0,049	0,049	0,257	-0,208	0,1335	0,1515	0,2985	0,143	0,575	-0,433
97	D	0,059	0,05	0,06	0,056	0,168	-0,11	0,14	0,102	0,058	0,121	0,257	-0,136	0,1144	0,1151	0,1159	0,115	0,218	-0,103
103	E	0,061	0,057	0,063	0,060	0,168	-0,11					0,257	-0,257	0,0979	0,0666	0,1027	0,089	0,218	-0,129

Tabela VIII: Resultados das leituras do método quantitativo para a produção de biofilme

Isolado		Dia 1						Dia 2						Dia 3					
		DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cot N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor
2	D	0,066	0,083	0,064	0,071	0,222	-0,15	0,05	0,088	0,043	0,047	0,283	-0,237	0,1392	0,1367	0,1609	0,1456	0,247	-0,101
3	D	0,073	0,056	0,093	0,074	0,222	-0,15	0,065	0,06	0,074	0,066	0,283	-0,217	0,16	0,1555	0,0811	0,158	0,247	-0,089
3	E	0,103	0,137	0,089	0,110	0,222	-0,11	0,101	0,065	0,067	0,066	0,283	-0,217	0,0999	0,0796	0,0874	0,089	0,247	-0,158
4	D	0,065	0,062	0,066	0,064	0,222	-0,16	0,072	0,119	0,079	0,090	0,283	-0,193	0,0761	0,0754	0,068	0,073	0,247	-0,174
5	D	0,19	0,158	0,177	0,175	0,222	-0,05	0,114	0,072	0,07	0,085	0,283	-0,198	0,089	0,112	0,113	0,105	0,222	-0,117
6	D	0,055	0,061	0,063	0,060	0,222	-0,16	0,086	0,066	0,064	0,072	0,283	-0,211	0,0637	0,0648	0,0803	0,070	0,575	-0,505
6	E	0,071	0,059	0,082	0,071	0,222	-0,15	0,049	0,064	0,098	0,057	0,283	-0,227	0,0875	0,1272	0,0833	0,085	0,247	-0,162
7	D	0,059	0,052	0,064	0,058	0,222	-0,16	0,052	0,049	0,167	0,051	0,283	-0,233	0,0689	0,0674	0,0787	0,072	0,247	-0,175
7	E	0,091	0,08	0,066	0,079	0,222	-0,14	0,15	0,049	0,081	0,116	0,283	-0,168	0,1251	0,074	0,1176	0,106	0,247	-0,141
8	E	0,063	0,08	0,082	0,075	0,222	-0,15	0,092	0,131	0,058	0,112	0,283	-0,172	0,0788	0,0736	0,0944	0,082	0,247	-0,165
9	D	0,064	0,061	0,044	0,056	0,222	-0,17	0,06	0,046	0,046	0,051	0,283	-0,232	0,0953	0,1037	0,0932	0,097	0,575	-0,478
9	E	0,073	0,074	0,077	0,075	0,222	-0,15	0,057	0,051	0,075	0,061	0,283	-0,222	0,1023	0,0997	0,0832	0,095	0,247	-0,152
10	D1	0,092	0,081	0,071	0,081	0,222	-0,14	0,049	0,074	0,06	0,061	0,283	-0,222	0,0972	0,0893	0,0931	0,093	0,247	-0,154
12	E1	0,058	0,115	0,094	0,105	0,222	-0,12	0,14	0,159	0,07	0,150	0,283	-0,134	0,0842	0,08	0,0758	0,080	0,247	-0,167
15	D	0,057	0,055	0,109	0,056	0,222	-0,17	0,041	0,049	0,047	0,046	0,283	-0,237	0,1019	0,1055	0,1099	0,106	0,247	-0,141
16	D	0,061	0,056	0,06	0,059	0,222	-0,16	0,046	0,043	0,048	0,046	0,283	-0,237	0,0831	0,0998	0,1023	0,095	0,247	-0,152
16	E	0,043	0,046	0,045	0,045	0,222	-0,18	0,049	0,048	0,055	0,051	0,283	-0,232	0,0796	0,0699	0,0854	0,078	0,247	-0,169
17	E	0,05	0,044	0,054	0,049	0,222	-0,17	0,072	0,059	0,047	0,059	0,283	-0,224	0,0888	0,0774	0,0839	0,083	0,247	-0,164
18	D	0,053	0,053	0,073	0,060	0,222	-0,16	0,049	0,045	0,044	0,046	0,283	-0,237	0,0806	0,0858	0,0769	0,081	0,575	-0,494
20	E	0,059	0,069	0,057	0,062	0,222	-0,16	0,062	0,053	0,124	0,058	0,283	-0,226	0,0952	0,0847	0,1276	0,103	0,247	-0,145
27	D	0,057	0,059	0,084	0,067	0,222	-0,16	0,055	0,057	0,059	0,057	0,283	-0,226	0,1095	0,1397	0,1014	0,117	0,247	-0,130
28	D	0,061	0,064	0,054	0,060	0,222	-0,16	0,059	0,051	0,068	0,059	0,283	-0,224	0,097	0,1065	0,0885	0,097	0,247	-0,150
28	E	0,057	0,053	0,062	0,057	0,222	-0,16	0,072	0,08	0,057	0,070	0,283	-0,213	0,1929	0,1332	0,1313	0,152	0,247	-0,095
30	D	0,052	0,061	0,059	0,057	0,222	-0,16	0,1	0,069	0,121	0,111	0,283	-0,173	0,1642	0,1177	0,0729	0,141	0,247	-0,106
31	D	0,092	0,083	0,054	0,088	0,222	-0,13	0,052	0,057	0,053	0,054	0,283	-0,229	0,0813	0,138	0,0749	0,078	0,247	-0,169
31	E	0,061	0,064	0,063	0,063	0,222	-0,16	0,045	0,044	0,045	0,045	0,283	-0,238	0,0683	0,0665	0,0854	0,073	0,247	-0,174
32	D	0,06	0,056	0,049	0,055	0,222	-0,17	0,057	0,053	0,058	0,056	0,283	-0,227	0,1072	0,1303	0,0955	0,111	0,247	-0,136
32	E	0,053	0,05	0,065	0,056	0,222	-0,17	0,052	0,055	0,047	0,051	0,283	-0,232	0,1076	0,0634	0,0686	0,080	0,247	-0,167
33	D2	0,066	0,068	0,068	0,067	0,222	-0,15	0,062	0,099	0,068	0,076	0,283	-0,207	0,16	0,1343	0,136	0,143	0,575	-0,432
33	E	0,055	0,075	0,093	0,074	0,168	-0,09	0,071	0,071	0,052	0,065	0,257	-0,192	0,0748	0,0757	0,1275	0,093	0,575	-0,482
34	E	0,069	0,059	0,053	0,060	0,168	-0,11	0,049	0,056	0,064	0,056	0,257	-0,201	0,0695	0,0745	0,0725	0,072	0,247	-0,175
37	D	0,112	0,082	0,057	0,070	0,168	-0,10	0,066	0,105	0,148	0,127	0,257	-0,131	0,1433	0,1725	0,1548	0,157	0,575	-0,418
38	E	0,053	0,104	0,078	0,066	0,168	-0,10	0,061	0,081	0,077	0,073	0,257	-0,184	0,0778	0,0795	0,0662	0,075	0,247	-0,173
53	D	0,065	0,083	0,116	0,074	0,168	-0,09					0,257	-0,257	0,1527	0,1472	0,1163	0,139	0,575	-0,436
86	D	0,081	0,072	0,077	0,077	0,168	-0,09					0,257	-0,257	0,1454	0,0762	0,0796	0,078	0,218	-0,140
93	D	0,071	0,096	0,09	0,086	0,168	-0,08	0,048	0,049	0,049	0,049	0,257	-0,208	0,1335	0,1515	0,2985	0,143	0,575	-0,433
97	D	0,059	0,05	0,06	0,056	0,168	-0,11	0,14	0,102	0,058	0,121	0,257	-0,136	0,1144	0,1151	0,1159	0,115	0,218	-0,103
103	E	0,061	0,057	0,063	0,060	0,168	-0,11					0,257	-0,257	0,0979	0,0666	0,1027	0,089	0,218	-0,129

Isolado	Dia 1						Dia 2						Dia 3						
	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cot N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor	DO-1	DO-2	DO-3	Média	Cont N	Valor	
242	E	0,07	0,049	0,054	0,058	0,096	-0,04	0,136	0,141	0,189	0,155	0,276	-0,121	0,0651	0,065	0,0769	0,069	0,218	-0,149
243	D	0,045	0,047	0,043	0,045	0,096	-0,05	0,057	0,049	0,072	0,059	0,276	-0,217	0,0869	0,1148	0,1912	0,101	0,218	-0,117
243	E	0,049	0,049	0,047	0,048	0,096	-0,05	0,075	0,079	0,079	0,078	0,276	-0,198	0,1447	0,0984	0,2948	0,122	0,651	-0,529
253	D	0,045	0,046	0,048	0,046	0,096	-0,05	0,143	0,176	0,171	0,163	0,276	-0,113	0,0647	0,0603	0,0601	0,062	0,218	-0,156
253	E	0,045	0,05	0,045	0,047	0,096	-0,05	0,109	0,08	0,143	0,111	0,276	-0,165	0,0673	0,1156	0,1042	0,110	0,218	-0,108
256	D	0,041	0,046	0,056	0,048	0,096	-0,05	0,067	0,057	0,064	0,063	0,276	-0,213	0,0616	0,0604	0,0648	0,062	0,218	-0,156
256	E	0,963	0,891	1,423	1,092	0,096	1,00	0,168	0,283	0,322	0,303	0,276	0,027	3,2431	3,0869	4	3,443	0,218	3,225
257	D	0,048	0,049	0,049	0,049	0,096	-0,05	0,061	0,054	0,087	0,067	0,276	-0,209	0,3711	0,3231	0,3286	0,341	0,651	-0,310
274	E1	3,002	1,931	2,13	2,354	0,175	2,18	0,605	0,641	0,52	0,589	0,276	0,313	4	4	4	4,000	0,394	3,606
278	D	0,124	0,117	0,132	0,124	0,175	-0,05	0,083	0,065	0,066	0,071	0,276	-0,205	0,4577	0,4519	0,4581	0,456	0,651	-0,195
280	D	2,725	2,381	2,654	2,587	0,175	2,41	1,299	1,331	1,552	1,394	0,276	1,118	4	4	4	4,000	0,394	3,606
280	E2	0,066	0,057	0,055	0,059	0,175	-0,12	0,082	0,062	0,101	0,082	0,276	-0,194	0,1091	0,1438	0,178	0,144	0,394	-0,250
284	E	0,059	0,053	0,051	0,054	0,175	-0,12	0,136	0,108	0,219	0,122	0,276	-0,154	0,1642	0,2386	0,1657	0,165	0,394	-0,229
287	D	2,256	2,873	2,11	2,413	0,175	2,24	1,125	1,021	1,072	1,073	0,134	0,939	3,5966	3,3193	3,1835	3,366	0,394	2,972
287	E	1,044	0,674	1,561	1,303	0,175	1,13	1,029	1,353	1,219	1,200	0,134	1,066	3,7077	4	4	3,903	0,394	3,509
289	E	0,094	0,079	0,054	0,076	0,175	-0,10	0,198	0,118	0,113	0,1155	0,134	-0,019	0,1492	0,144	0,1449	0,146	0,394	-0,248
295	D	0,068	0,049	0,05	0,056	0,175	-0,12	0,099	0,099	0,115	0,104	0,134	-0,030	0,0757	0,0674	0,1153	0,072	0,394	-0,322
298	D	0,047	0,064	0,071	0,061	0,175	-0,11	0,123	0,108	0,107	0,113	0,134	-0,021	0,0902	0,2444	0,2914	0,268	0,394	-0,126
300	D	0,047	0,052	0,072	0,057	0,175	-0,12	0,158	0,154	0,115	0,142	0,134	0,008	0,1534	0,1573	0,141	0,151	0,651	-0,500
301	D1	0,062	0,054	0,041	0,052	0,175	-0,12	0,095	0,115	0,128	0,113	0,134	-0,021	0,0665	0,097	0,0932	0,086	0,394	-0,308
304	D	0,043	0,075	0,048	0,055	0,175	-0,12	0,127	0,093	0,069	0,110	0,134	-0,024	0,1885	0,1026	0,1591	0,150	0,651	-0,501
315	D	0,038	0,04	0,062	0,047	0,175	-0,13	1,203	0,479	0,542	0,511	0,134	0,377	0,105	0,224	0,139	0,122	0,222	-0,100
315	E	0,09	0,159	0,055	0,073	0,175	-0,10	0,074	0,113	0,062	0,068	0,134	-0,066	0,0718	1,0473	0,0818	0,077	0,394	-0,317
320	E	0,19	0,24	0,06	0,215	0,175	0,04	0,09	0,091	0,094	0,092	0,134	-0,042	0,0956	0,11	0,1299	0,112	0,651	-0,539
323	D	0,053	0,047	0,053	0,051	0,175	-0,12	0,066	0,081	0,085	0,077	0,134	-0,057	0,1026	0,0772	0,0754	0,085	0,394	-0,309
324	E2	0,087	0,049	0,335	0,068	0,175	-0,11	0,766	0,534	0,535	0,612	0,134	0,478	0,0625	0,0631	0,0639	0,063	0,394	-0,331
328	E2	0,137	0,052	0,055	0,054	0,175	-0,12	0,716	1,398	1,591	1,235	0,134	1,101	0,0834	0,0772	1,8715	0,080	0,394	-0,314
330	E1	0,19	0,24	0,06	0,215	0,175	0,04	1,064	1,152	2,042	1,108	0,134	0,974	0,067	0,113	0,061	0,064	0,222	-0,158
337	D1	0,037	0,043	0,04	0,040	0,175	-0,14	0,054	0,138	0,208	0,133	0,134	-0,001	0,1289	0,0768	0,3812	0,103	0,394	-0,291
337	E	0,253	0,273	0,314	0,280	0,175	0,11	1,025	0,359	1,609	1,317	0,134	1,183	0,5572	0,0734	0,3151	0,315	0,394	-0,079

Tabela IX: Resultado do TCM e produção de zoogleia de acordo com os métodos qualitativo e quantitativo

Isolados	Efectivo	Reacção TCM	Teste qualitativo	Teste quantitativo
2 D	1	3+	V	≤ 0
3 D	1	3+	V	≤ 0
3 E	1	3+	V	≤ 0
4 D	1	3+	V	≤ 0
5 D	1	3+	V	≤ 0
6 D	1	2+	V	≤ 0
6 E	1	3+	V	≤ 0
7 D	1	3+	V	≤ 0
7 E	1	3+	V	≤ 0
8 E	1	2+	V	≤ 0
9 D	1	2+	V	≤ 0
9 E	1	1+	V	≤ 0
10 D1	1	3+	V	≤ 0
12 E1	1	MC	V	≤ 0
15 D	1	2+	V	≤ 0
16 D	1	3+	V	≤ 0
16 E	1	3+	V	≤ 0
17 E	1	MC	V	≤ 0
18 D	1	MC	V	≤ 0
20 E	1	MC	V	≤ 0
27 D	2	2+	V	≤ 0
28 D	2	3+	V	≤ 0
28 E	2	3+	V	≤ 0
30 D	2	3+	V	≤ 0
31 D	2	3+	V	≤ 0
31 E	2	2+	V	≤ 0
32 D	2	2+	V	≤ 0
32 E	2	2+	V	≤ 0
33 D2	2	3+	V	≤ 0
33 E	2	3+	V	≤ 0
34 E	2	3+	V	≤ 0
37 D	2	2+	V	≤ 0
38 E	2	3+	V	≤ 0
53 E	3	3+	V	≤ 0
86 D	4	1+	V	≤ 0
93 D	4	1+	V	≤ 0
97 D	4	2+	V	≤ 0
103 E	4	2+	V	≤ 0

Isolados	Efectivo	Reacção TCM	Teste qualitativo	Teste quantitativo
165 D	10	1+	V	≤ 0
166 E	10	1+	V	≤ 0
169 D	11	1+	V	≤ 0
170 D	11	2+	V	≤ 0
176 D	11	1+	V	≤ 0
177 E1	11	2+	V	≤ 0
182 E	11	3+	V	≤ 0
186 D	13	1+	V	≤ 0
186 E	13	2+	V	≤ 0
192 D	13	3+	V	≤ 0
192 E2	13	3+	V	≤ 0
197 D	13	3+	V	≤ 0
200 E	13	2+	P	> 0
203 D	13	2+	V	≤ 0
204 D1	13	2+	V	≤ 0
204 E	13	1+	V	≤ 0
212 E	14	2+	V	> 0
213 E	14	3+	V	≤ 0
218 E	14	3+	V	≤ 0
222 E2	14	3+	V	≤ 0
232 D	14	2+	P	> 0
234 D	11 (*)	2+	V	≤ 0
235 D	11 (*)	2+	V	≤ 0
239 D3	11 (*)	S	P	> 0
242 E	11 (*)	1+	V	≤ 0
243 D	11 (*)	2+	V	≤ 0
243 E	11 (*)	2+	V	≤ 0
253 D	13 (*)	2+	V	≤ 0
253 E	13 (*)	2+	V	≤ 0
256 D	13 (*)	2+	V	≤ 0
256 E	13 (*)	3+	P	> 0
257 D	13 (*)	S	V	≤ 0
274 E1	15	1+	P	> 0
278 D	15	1+	V	≤ 0
280 D	15	2+	P	> 0
280 E2	15	2+	V	≤ 0
284 E	15	S	V	≤ 0
287 D	15	3+	P	> 0

108 D	4	3+	V	≤ 0	287 E	15	2+	P	> 0
113 E	4	3+	V	≤ 0	289 E	15	3+	V	≤ 0
123 E	5	1+	V	≤ 0	295 D	16	2+	V	≤ 0
125 E2	5	1+	V	≤ 0	298 D	16	3+	V	≤ 0
136 E1	6	3+	V	≤ 0	300 D	16	2+	V	≤ 0
139 E1	6	1+	V	≤ 0	301 D1	16	2+	V	≤ 0
140 D	6	MC	V	≤ 0	304 D	16	3+	V	≤ 0
140 E	6	MC	V	≤ 0	315 D	17	S	V	≤ 0
142 E	6	3+	V	≤ 0	315 E	17	S	V	≤ 0
143 E	6	1+	V	≤ 0	320 E	17	1+	V	≤ 0
144 E	6	1+	V	≤ 0	323 D	17	S	V	≤ 0
151 E	9	1+	V	≤ 0	324 E2	17	2+	V	≤ 0
153 E	9	1+	V	≤ 0	328 E2	17	1+	V	≤ 0
154D	9	2+	V	≤ 0	330 E1	17	S	V	> 0
155 E	9	1+	V	≤ 0	337 D1	17	S	V	≤ 0
163 E	10	2+	V	≤ 0	337 E	17	2+	V	> 0
164 E	10	2+	V	≤ 0					

(*) – Isolados provenientes duma segunda colheita no efectivo anteriormente amostrado
V – colónia vermelha; P – Colónia preta; ≤ 0 – resultado inferior ou igual a zero em pelo menos 2 dos 3 dias; > 0 – resultado maior que zero em pelo menos 2 dos 3 dias (Tabela VIII)

Tabela X: Resultados dos ensaios de adesão e invasão de células BME por *Staphylococcus epidermidis*

Isolado	Poço	ADESÃO														INVASÃO		
		Diluição	Adesão à placa							Adesão a BME							UFC/ml	Lisostafina
			Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml		LOG10	%	Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml		LOG10	%		
192 D	1	-2	166	178	172	8600				108	96	102	5100				26	0
192 D	2	-2	227	207	217	10850				202	250	226	11300				22	0
192 D	3	-2	158	192	175	8750	9400	3,97313	1,49	236	193	214,5	10725	9041,67	3,95625	1,44	28	3
200 E	1	-2	370	353	361,5	18075				273	232	252,5	12625				Inc	24
200 E	2	-2	312	295	303,5	15175				51	56	53,5	2675				137	31
200 E	3	-2	247	233	240	12000	15083,3	4,1785	1,19	376	376	376	18800	11366,7	4,05563	0,90	358	94
232 D	1	-2	154	156	155	7750				149	120	134,5	6725				16	8
232 D	2	-2	214	226	220	11000				113	111	112	5600				36	3
232 D	3	-2	54	56	55	2750	7166,67	3,85532	2,24	108	98	103	5150	5825	3,7653	1,82	39	16
239 D3	1	-2	74	18	46	2300				11	78	44,5	2225				257	1
239 D3	2	-2	159	78	118,5	5925				76	60	68	3400				18	0
239 D3	3	-2	81	122	101,5	5075	4433,33	3,64673	2,86	163	102	132,5	6625	4083,33	3,61101	2,63	28	0
256 D	1	-2	310	329	319,5	15975				123	115	119	5950				49	20
256 D	2	-2	345	349	347	17350				198	207	202,5	10125				279	2
256 D	3	-2	39	30	34,5	1725	11683,3	4,06757	0,90	262	224	243	12150	9408,33	3,97351		24	64
256 E	1	-2	323	346	334,5	16725				143	153	148	7400				577	365
256 E	2	-2	348	346	347	17350				219	245	232	11600				710	615
256 E	3	-2	450	435	442,5	22125	18733,3	4,27262	2,07	266	256	261	13050	10683,3	4,02871		512	457
Branco	1	ND	0							2	NA						0	0
Branco	2	ND	0							0	NA						0	0
Branco	3	ND	0							0	NA						0	0
280 D	1	-2	38	80	59	2950				97	104	100,5	5025				57	5
280 D	2	-2	103	113	108	5400				236	234	235	11750				153	15
280 D	3	-2	126	79	102,5	5125	4491,67	3,65241	1,17	181	193	187	9350	8708,33	3,93994		128	11

Isolado	Poço	ADESÃO														INVASÃO		
		Diluição	Adesão à placa						Adesão a BME						UFC/ml	Lisostafina		
			Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml		LOG10	%	Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml				LOG10	%
280 E2	1	-2	361	378	369,5	18475				283	285	284	14200				96	53
280 E2	2	-2	414	399	406,5	20325				449	558	503,5	25175				447	Inc
280 E2	3	-2	400	446	423	21150	19983,3	4,30067	1,67	291	371	331	16550	18641,7	4,27048		312	430
287 D	1	-2	0	71	35,5	1775				21	29	25	1250				31	12
287 D	2	-2	67	60	63,5	3175				21	38	29,5	1475				30	6
287 D	3	-2	34	6	20	1000	1983,33	3,2974	0,39	30	25	27,5	1375	1366,67	3,13566		31	39
287 E	1	-2	161	113	137	6850				113	113	113	5650				56	148
287 E	2	-2	116	118	117	5850				106	68	87	4350				25	11
287 E	3	-2	137	125	131	6550	6416,67	3,80731	0,66	113	114	113,5	5675	5225	3,71809		12	0
304 D	1	-2	222	221	221,5	11075				84	85	84,5	4225				5	1
304 D	2	-2	211	213	212	10600				11	8	9,5	475				8	2
304 D	3	-2	353	373	363	18150	13275	4,12303	0,40	110	126	118	5900	3533,33	3,54818		15	2
320 E	1	-2	286	287	286,5	14325				0	45	22,5	1125				13	20
320 E	2	-2	272	238	255	12750				54	72	63	3150				15	38
320 E	3	-2	201	197	199	9950	12341,7	4,09137	2,60	82	89	85,5	4275	2850	3,45484		9	11
Cont +	1	-2	120	113	116,5	5825				70	88	79	3950				5	6
Cont +	2	-2	269	284	276,5	13825				173	145	159	7950				6	3
Cont +	3	-2	144	154	149	7450	9033,33	3,95585	0,74	143	124	133,5	6675	6191,67	3,79181		3	2
Cont -	1	-3	36	32	34	1700				38	54	46	2300				4 e 6	162
Cont -	2	-3	51	44	47,5	2375				82	66	74	3700				5 e 2	175
Cont -	3	-3	60	52	56	2800	2291,67	3,36015	0,10	58	96	77	3850	3283,33	3,51631		4 e 4	201
Branco	1	ND	0							NA	NA						0	0
Branco	2	ND	0							0	NA						0	0
Branco	3	ND	0							1	NA						0	0

Isolado	Poço	ADESÃO														INVASÃO		
		Diluição	Adesão à placa						Adesão a BME						UFC/ml	Lisostafina		
			Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml		LOG10	%	Placa 1	Placa 2	Média	UFC/ml				LOG10	%
280 E2	1	-2	361	378	369,5	18475				283	285	284	14200				96	53
280 E2	2	-2	414	399	406,5	20325				449	558	503,5	25175				447	Inc
280 E2	3	-2	400	446	423	21150	19983,3	4,30067	1,67	291	371	331	16550	18641,7	4,27048		312	430
287 D	1	-2	0	71	35,5	1775				21	29	25	1250				31	12
287 D	2	-2	67	60	63,5	3175				21	38	29,5	1475				30	6
287 D	3	-2	34	6	20	1000	1983,33	3,2974	0,39	30	25	27,5	1375	1366,67	3,13566		31	39
287 E	1	-2	161	113	137	6850				113	113	113	5650				56	148
287 E	2	-2	116	118	117	5850				106	68	87	4350				25	11
287 E	3	-2	137	125	131	6550	6416,67	3,80731	0,66	113	114	113,5	5675	5225	3,71809		12	0
304 D	1	-2	222	221	221,5	11075				84	85	84,5	4225				5	1
304 D	2	-2	211	213	212	10600				11	8	9,5	475				8	2
304 D	3	-2	353	373	363	18150	13275	4,12303	0,40	110	126	118	5900	3533,33	3,54818		15	2
320 E	1	-2	286	287	286,5	14325				0	45	22,5	1125				13	20
320 E	2	-2	272	238	255	12750				54	72	63	3150				15	38
320 E	3	-2	201	197	199	9950	12341,7	4,09137	2,60	82	89	85,5	4275	2850	3,45484		9	11
Cont +	1	-2	120	113	116,5	5825				70	88	79	3950				5	6
Cont +	2	-2	269	284	276,5	13825				173	145	159	7950				6	3
Cont +	3	-2	144	154	149	7450	9033,33	3,95585	0,74	143	124	133,5	6675	6191,67	3,79181		3	2
Cont -	1	-3	36	32	34	1700				38	54	46	2300				4 e 6	162
Cont -	2	-3	51	44	47,5	2375				82	66	74	3700				5 e 2	175
Cont -	3	-3	60	52	56	2800	2291,67	3,36015	0,10	58	96	77	3850	3283,33	3,51631		4 e 4	201
Branco	1	ND	0							NA	NA						0	0
Branco	2	ND	0							0	NA						0	0
Branco	3	ND	0							1	NA						0	0

Tabela XII: - Proteínas de *Staphylococcus epidermidis* reconhecidas por IgG no soro sanguíneo das 4 ovelhas mastíticas e das 2 ovelhas de controlo

Proteína PM (kD)	Extractos bacterianos													
	1-10D1	2-140	3-142	4-163	5-177	6-143	7-144	8-176	9-182	10-151	11-153	12-165	13-169	14-170
146-150			...345				...34					...3.5	...3...66
132-140		4.6			..2.4	..2.44	45			..2.45	
120-120		4.6	1234563	123.5	123.5	123.5	123.5	123454	...34	..2345	
105-116			...34	4	...34		545	...3455	
97														
92										..2	..2			
79-85-90				..23456	..2455	..23456	..2345		...3		..2	
74-78					...3					...3		...3	...3	...3
70-75		6		66		6666	
66		5		55		545	..2.4545	
61-62			..2										..2	
59-60	1...4.6	1...4.6	12.4.6	1.....6	1...4.64.64.6	1...4.6	1...4.6	12.4.6	12.4.6	12.....6	12.4.6	12.4.6
57	..23..56	..23..56	..23.5	..23.5	..23.5	..23.5	...3.5	...3.5	...3.5	...3.5	...3.5	...3.5	...3.5	...3.5
53-54	..2.....6	..2	..2		..2	...3								..2
48-50	..234	..23	..23	..2	...3	..234	...344		..2	..2.4	..2.4	..2	..2
46-47					555						
45	...34	1..345	1...45	1	1..34	1..3.5	1..3	15	1.....5	1.....5	1	1	1
43				..2...5	..2	..2...5	..2...5	..2...5555555
39-40	6											6
37-38	...3	...3.5			...3.5	...3.55		55555
35														
33				..2		..2	..2				..2	..2		
32		..2	..23	...3		..23	..235		..23.5	..23.5	..23.5	..23.5	..23.5
30-31		1	1	1.....5	1	1.....5	1.....5	1.....56	1.....56	1	1	1	1.....6	1
29			56		..2	..25656		56		
25-26	..23	..23..56	..23..56	..23	..23..56	..23	..23	..23	..23..56	...3	...3	...3	...3	...3...6
2456										66	
21														
20														

1 a 4 – ovelhas mastíticas; 5 e 6 – ovelhas controlo

Tabela XIII: - Proteínas de *Staphylococcus epidermidis* reconhecidas por IgA no soro de leite das 5 ovelhas mastíticas e das 2 ovelhas de controlo

Proteína PM (kD)	Extractos bacterianos													
	1-10D1	2-140	3-142	4-163	5-177	6-143	7-144	8-176	9-182	10-151	11-153	12-165	13-169	14-170
146-164		45	1....45.7		1....45.7	1....45.7	1....45.7	1.....7	1....45.7	5	1.....77
128-143		4545	444	444		
120-137			1.3											
109-116			1.....7		77			..23.....7	..23.....7	...3.....7		
97						..2				..24	...34	..2	
84-91-95555455454545454545	1....4555
81-85									1	..2	..2	...3		
78-81			7			77					
75-79-82			4		4	44545	1.....5	1	
70-75				1.....	4..			1.....			1.3....		
66													1	
60	1.3.5	1.3.5.7	...345.7	...34...7	...3454..44	..2.4...7	12345	12345	12345	12345	12345
57-59	...3...67	1.3..567	1.34..67	1.3..5677456745675674..67	1234567	1234567	1234567	1234567	1.34567
53-55		..2.....7	..2...5.7	5					5.75.75	..2...5.7
48-504555555554554545	4
46-47	1.....6	..2.4.6	..2.4.6	..2.....67	..2.4.64.6	..2.4.66	..2.....64.6	...34..6	..234.67	...34.67	..234..6
45	1....45	1.....5.7	1.....7	1	1.3.....7	1.....7	12.....7	1.34...7	1.34...7	12.....7	...3	1.3.5.7	1.3.....7	123
41-4345	1....45	1....45.7	1.....75	1	1	1.....7	1.....7	1.....5.75.7	1.....5	1.....55
39-40	444	4				...3	..234	..234	..234	..234
36-37	...34	...34567	123456	1.345	1.3....	...344			..23.....7	..23456	..234..	1234	...3...67
35		6767	4.674.674.674...77	..2.456	..2.4564.64.67
31-325567567455.7555565674567456745674.67
29	...3.5555555555	...3.5	...345	..2...5	..2...5
27	..2	..2		..2	..2	..2	..2		..2	..2	..2	..2	..2	..2
26	123	123.....7	123	12.....7	123	123.....7	123.....7	123.....7	123.....7	123	123	1234	123	123
21-2254564564555655455555656
19-20		44	4454544545454

1 a 5 – ovelhas mastíticas; 6 e 7 – ovelhas controlo

Tabela XIV: - Proteínas de *Staphylococcus epidermidis* reconhecidas por IgG no soro de leite das 5 ovelhas mastíticas

Proteína PM (kD)	Extractos bacterianos													
	1-10D1	2-140	3-142	4-163	5-177	6-143	7-144	8-176	9-182	10-151	11-153	12-165	13-169	14-170
146-164												3....53
128-143		45							12345				
120-137		5									12345		
109-116					44			..2.4	..2.4	12..4		
97345	45							..2.4	..2.4	1....4		
84-91-95				1..345				1..345	1..345	..2	..2.45			
81-85					12345		4454454	4
78-81					12345									1..3
75-79-82										1234	123	123....5	12....5	12..45
70-75							1....4		4545	1....45		
66														
60				12345		12345	12345	12345	123..5	1..345	1..345	1..345	3
59	12345	12345	12345	12345			1	12345	..2.45	..2.45	..2..	12345	12..45
57						1				12345	12345	12345	1..3....5	
50-513....5345345	345			45		..2	..2		1..345
48-50										1..345	1..345	1..345		
46				123		..2	..2	..2.45	..2.4545		4	..2..45
45	12345	12345	1234545	1234533....533	1..3
43										1....45	12..45	12..45	1..345	
39-40													1.....5	
37		123..75	12..45	355				3333	1..3
35	1234	12..4	12..4		12..4	12..4545	1....45	12..45	12..4	12..4	12..4	12..4	12..4
33									4444	
32							..2	..2	..2	..2	..2	..2	..2	..2
31	..23....5	..2....5	..23....5	..2	..23....53....53....5	..23....5	..2	..23	..23	..23	..23
29														
2753....53....5	55			345345345	345
21				45				45	1..345	1..345	1..345	
20				45				5	1..3455	1..345	

1 a 5 – ovelhas mastíticas; Nota: não houve reconhecimento de epitopos por IgG no leite das ovelhas controlo

Anexo 2 – REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Agar Vermelho do Congo (CRA)

Brain heart infusion broth (BHIB) (Oxoid, CM225) – 37 g

Agar bacteriológico nº 1 (Oxoid, L11) – 10 g

Vermelho do Congo (Merck, 101340) – 0,8g

Água destilada – 900 mL

Depois de autoclavar, juntar por filtração (0,2 µm)

Sacarose (Merck, 107651) – 50 g

Água destilada – 100 mL

Tampão fosfato (PBS)

NaCl - 8 g

KCl - 0,2 g

Na₂HPO₄ - 1,15 g

KH₂PO₄ - 0,2 g

H₂O destilada - 800 mL

Acertar o pH 7,4, e ajustar o volume a 1 litro

PBS-Tween – 0,05% (V/V) Tween 20 (Sigma, P-7949)

Meio de cultura para células

Ham's F-12 (Invitrogen, 21765-029) – 200 mL

RPMI1640 (Invitrogen, 31870-025) – 115 mL

NCNT 135 (Invitrogen, 41350-026) – 100 mL

FCS (Invitrogen, 10270-106) – 50 mL

Lactose (Sigma, L-2643) – 0,5 g (em 5 mL de RPMI)

Lactalbumin hydrolysate (Sigma, L-9010) – 0,5 g (em 5 mL de RPMI)

GSH (Sigma, G-6013) – 1,2 mM (em RPMI)

L-ascorbic acid (Sigma, A-4544) – 0,005 g (em 1 mL de RPMI)

Hydrocortisone (Sigma, H-0135) – 10 mL (de solução 50µg/mL)

Insulin (Sigma, I-1882) – 50 µL (de solução 10 mg/mL)

Antibiotic/antimycotic mix (Sigma, A-5955) – 10 mL



Reagentes para SDS-PAGE

Gel de separação

	<u>1 gel</u>
Água desionizada	16,0 mL
1.5 M Tris HCl pH 8,8 (1)	10,0 mL
Acrilamida/bis. (2)	13,5 mL
10% SDS (Sigma, L-3771)	400,0 µL
AMPS (Bio-Rad, 161-0700) (0,1g / 1 mL H ₂ O)	200,0 µL
TEMED (Bio-Rad, 161-0800)	20,0 µL

Gel de concentração

	<u>1 gel</u>
Água desionizada	6,1 mL
0,5 M Tris HCl pH 6,8 (3)	2,5 mL
Acrilamida/bis (2)	1,3 mL
10% SDS	100,0 µL
AMPS (0,1g / 1 mL H ₂ O)	50,0 µL
TEMED	10,0 µL

(1) 1,5 M Tris HCl pH 8,8

Tris (Sigma, T-8404) – 9,0825g

Água desionizada – 30 mL

Acertar o pH e perfazer 50 mL com água desionizada

(2) Acrilamida / bisacrilamida

Acrilamida (Bio-Rad, 161-0101) – 29 g

Bisacrilamida (Bio-Rad, 161-0201) – 1 g

Água desionizada – para perfazer 100 mL

Filtrar

(3) 0,5 M Tris HCl pH 6,8

Tris – 3,0275 g

Água desionizada – 30 mL

Acertar o pH e perfazer 50 mL com água desionizada

Tampão redutor de amostra

	(concentração dupla)
Água desionizada	para perfazer 20 mL
0,5 M Tris HCl pH 6,8	5 mL
Glicerol (Sigma, G 8773)	4 mL
10% SDS	8 mL
2-mercaptoetanol (Sigma, M-7154)	2 mL
Azul de bromofenol (Sigma, B 8026)	

Tampão Tris-glicina-SDS pH 8,3 para electroforese

Solução *stock* Tris-glicina (4) – 200 mL

SDS 10% - 20 mL

Água desionizada – 1,780 mL

(4) solução *stock* Tris-glicina (10 X) pH 8,3

Tris – 30,0328 g

Glicina – 144,1344 g

Água desionizada – 1 L

(Guardar a 4° C)

Corante para geles

Metanol (Merck, 1.06009) – 400 mL

Azul de Coomassie (Bio-Rad, 161-0400) – 0,25 g (agitar até dissolver)

Ácido acético (Merck, 1.00063) – 70 mL

Água desionizada – para perfazer 1 L

Solução para descorar geles

Ácido acético – 70 mL

Metanol – 50 mL

Água desionizada – para perfazer 1 L

Reagentes para transferência electroforética

Tampão de transferência de Towbin pH 8,3

Solução *stock* Tris-glicina (4) – 400 mL

Metanol – 800 mL

Água desionizada – 2 800 mL

(Guardar a 4° C)

Corante para membranas de nitrocelulose

Solução *stock* (1%) de amido black (Bio-Rad, 161-0402) – 1 mL

Solução para descorar membranas – 9 mL

Solução descorante para membranas de nitrocelulose

Ácido acético – 150 mL

Metanol – 100 mL

Água desionizada – 1 750 mL