

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL BIOQUÍMICO DOS SOROS LÁCTEO E
SANGUÍNEO DE CABRAS COM MASTITE DE
OCORRÊNCIA NATURAL**

Diana Consuelo Cifuentes Sanchez

Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL BIOQUÍMICO DOS SOROS LÁCTEO E
SANGUÍNEO DE CABRAS COM MASTITE DE
OCORRÊNCIA NATURAL**

Diana Consuelo Cifuentes Sanchez

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2015

C569p Sanchez, Diana Consuelo Cifuentes
Perfil bioquímico dos soros lácteo e sanguíneo de cabras com mastite de ocorrência natural. / Diana Consuelo Cifuentes Sanchez. – Jaboticabal, 2016
xii, 49 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Jurandir Fagliari
Banca examinadora: Paulo Francisco Domingues, Viviani Gomes, Daniela Gomes Silva, Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplício
Bibliografia

1. Capra Hircus. 2. Glândula Mamária. 3. Inflamação. 4. Proteínograma. 5. SDS – PAGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.19-002:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “PERFIL BIOQUÍMICO DOS SOROS LÁCTEO E SANGUÍNEO DE CABRAS COM MASTITE DE OCORRÊNCIA NATURAL”

AUTORA: DIANA CONSUELO CIFUENTES SANCHEZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. PAULO FRANCISCO DOMÍNGUES

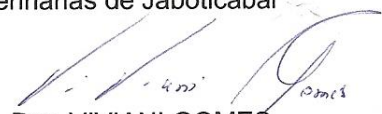
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu


Profa. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

Pós-Doutoranda / Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. KALINA MARIA DE MEDEIROS GOMES SIMPLICIO

Pós-Doutoranda / Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. VIVIANI GOMES

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Usp, São Paulo/SP

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DIANA CONSUELO CIFUENTES SANCHEZ – nascida em 10 de novembro de 1982 na cidade de Bogotá - Colômbia, filha de Isaias Cifuentes Vásquez e Efigenia Sánchez Mancera. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad de los Llanos – UNILLANOS – Villavicencio, em agosto de 2003, concluindo-o em dezembro de 2008. Realizou estágio junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” na área de Clínica Médica de Grandes Animais no ano de 2008. Iniciou o mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, em março de 2009, na FCAV-UNESP – Câmpus de Jaboticabal, como bolsista da CAPES. Defendeu a dissertação em fevereiro de 2011. Iniciou a especialização em gestão de sistemas de produção animal, área de conhecimento em Ciências Agrárias, em fevereiro de 2010, na FMVA-UNESP - Câmpus de Araçatuba. Concluiu, em janeiro de 2011. Coursou o doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, de março de 2012 a dezembro de 2015, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV-UNESP – Câmpus de Jaboticabal, como bolsista do programa PEC-PG.

O SENHOR é o meu pastor, nada me falta, Ele me faz descansar em verdes prados, a águas tranquilas me conduz. Restaura minhas forças, guia-me pelo caminho certo, por amor do seu nome. Se eu tiver de andar por vale escuro, não temerei mal nenhum, pois comigo estás. O teu bastão e teu cajado me dão segurança. Diante de mim preparas uma mesa aos olhos de meus inimigos; unges com óleo minha cabeça, meu cálice transborda. Felicidade e graça vão me acompanhar todos os dias da minha vida e vou morar na casa do Senhor por muitíssimos anos.

SALMO 23

DEDICO...

A ti meu amado **Deus** pelas oportunidades e por sempre me dar muito mais do que posso pedir ou sonhar.

Ao meu esposo **Leandro** e meu filho **Leandro Augusto** que são a materialização do amor divino.

Aos meus amados pais, **Isaias** e **Efigenia**, aos meus irmãos, **Paola**, **Andrea**, **Isaias** e **Jorge**, que são o meu porto seguro e aos meus sobrinhos **Tomas** e **Valentina**, que alegam os meus dias.

A minha querida velinha **Ligia Melo** por seu amor e suas orações.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **prof. Dr. José Jurandir Fagliari** pela confiança, apoio e exemplo como pessoa e profissional.

A minha co-orientadora **profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal** pela colaboração e ensinamentos.

Ao Programa **PEC-PG**, pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 5832110) e à **FAPESP** pelo auxílio financeiro (Processo: 2013/05507-6).

Aos meus amigos e equipe de trabalho **Kalina Simplício, Victor Santos, Hugo Bauab**, pela participação na fase experimental, sem vocês este experimento não teria sido o mesmo.

A **pós-doutoranda Daniela Gomes Silva** pelo exemplo de pesquisadora, ajuda na execução laboratorial e escrita desta tese.

Ao **prof. Dr. Gener Tadeu Pereira** pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao **prof. Dr. Luiz Francisco Prata** pelo ensinamento da técnica de contagem manual de células somáticas e interpretação dos resultados.

À **médica veterinária Ana Carol Siqueira** na leitura dos esfregaços lácteos.

À **médica veterinária Andréia Vaz**, pelo auxílio na caracterização dos microorganismos. Laboratório de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal - Departamento de Medicina Veterinária - ZMV - FZEA - USP

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV-UNESP, **Renata Lemos Nagib Jorge, Cláudia Aparecida da Silva Nogueira e Paulo César da Silva**, pelo auxílio no processamento das amostras e análises laboratoriais, e pela amizade.

A **FCAV – UNESP** – Câmpus de Jaboticabal, em particular ao curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, por ter me acolhido e proporcionado a possibilidade de realizar este trabalho.

SÚMARIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 OBJETIVO GERAL.....	9
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Propriedade e animais.....	10
4.2 Grupos experimentais.....	10
4.3 Exame clínico da glândula mamária.....	11
4.4 Colheita e preparo das amostras de secreção láctea e de sangue.....	11
4.4.1 Teste da caneca de fundo escuro e <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	12
4.5 Exames laboratoriais da secreção láctea.....	13
4.5.1 Contagem de células somáticas (CCS).....	13
4.5.1.1 Contagem automática.....	13
4.5.1.2 Contagem por microscopia direta.....	13
4.5.2 Exame microbiológico.....	14

4.5.3 Determinação do perfil bioquímico	16
4.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	16
4.6 Exames laboratoriais do soro sanguíneo.....	16
4.6.1 Determinação do perfil bioquímico	16
4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	17
4.7 Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 Exame da glândula mamária.....	18
5.2 Secreção láctea.....	19
5.2.1 Teste da caneca de fundo escuro.....	19
5.2.2 <i>California Mastitis Test</i> (CMT).....	19
5.2.3 Contagem de células somáticas (CCS).....	20
5.2.3.1 Contagem automática.....	20
5.2.3.2 Contagem por microscopia direta.....	22
5.2.4 Exame microbiológico.....	24
5.2.5 Perfil bioquímico do soro lácteo.....	25
5.2.6 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea.....	30
5.3 Secreção sanguínea.....	33
5.3.1 Perfil bioquímico sérico.....	33
5.3.2 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas.....	37

6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

unespUNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 013399/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Estudo microbiológico e bioquímico do leite e perfil bioquímico sanguíneo, com ênfase em proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, de cabras com mastite”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de agosto de 2014.

Jaboticabal, 12 de agosto de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

“PERFIL BIOQUÍMICO DOS SOROS LÁCTEO E SANGUÍNEO DE CABRAS COM MASTITE DE OCORRÊNCIA NATURAL”

RESUMO - O estudo teve como objetivo avaliar as alterações da secreção láctea de cabras com mastite mediante o uso do teste da caneca de fundo escuro, *California Mastitis Test* (CMT), contagem de células somáticas (CCS) e perfil microbiológico, bem como determinar o perfil bioquímico, em especial de proteínas de fase aguda, do soro sanguíneo e soro lácteo de cabras com mastite clínica ou subclínica, de ocorrência natural. Foram constituídos três grupos experimentais compostos de 30 metades mamárias de cabras saudáveis, com secreção láctea negativa na prova da caneca de fundo escuro, CMT e no exame microbiológico (grupo controle - G1), 30 metades mamárias com secreção láctea negativa ao teste da caneca de fundo escuro, reação moderada (2+) ou intensa (3+) no CMT e positividade no exame microbiológico (Grupo mastite subclínica - G2) e 12 metades mamárias com secreção láctea positiva na prova da caneca de fundo escuro e no exame microbiológico (grupo mastite clínica - G3). Após antissepsia dos tetos foram colhidas amostras de leite para CCS, cultura microbiológica e determinação do perfil bioquímico do soro lácteo, inclusive o proteinograma mediante fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e amostras de sangue venoso para determinação do perfil bioquímico sérico. A contagem automática de células somáticas (CCS) e por contagem microscopia direta foi maior nas amostras de secreção láctea das cabras com mastite subclínica (G2: 4.500.000 células/mL e 20.830.000 células/mL, respectivamente) e com mastite clínica (G3: 7.500.000 células/mL e 39.100.000 células/mL, respectivamente). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. foram os microrganismos isolados nas amostras de leite das cabras do G2 e G3. As amostras de soro lácteo das cabras do G2 e G3 apresentaram maiores atividades das enzimas fosfatase alcalina (G2: 122 U/L e G3: 207 U/L) e gamaglutamiltransferase (G2: 483 U/L e G3: 571 U/L) e maiores concentrações de albumina (G2: 0,18 g/dL e G3: 0,29 g/dL), proteína total (G2: 1,50 g/dL e G3: 1,67 g/dL), cloretos (G2: 190 mEq/L e G3: 202 mEq/L), ferro (G2: 13,4

$\mu\text{g/dL}$ e G3: 19,6 $\mu\text{g/dL}$), sódio (G2: 152 mMol/L e G3: 181 mMol/L), IgA (G2: 3,26 mg/dL e G3: 3,65 mg/dL), lactoferrina (G2: 111 mg/dL e G3: 127 mg/dL), IgG de cadeia pesada – IgG-CP (G2: 94,9 mg/dL e G3: 144 mg/dL), IgG de cadeia leve – IgG-CL (G2: 73,0 mg/dL e G3: 98,4 mg/dL), β -caseína (G2: 2,13 mg/dL e G3: 3,89 mg/dL) e β -lactoglobulina (G2: 693 mg/dL). As amostras de soro sanguíneo das cabras do G2 e do G3 apresentaram menores concentrações séricas de ureia (G2: 56,2 mg/dL e G3: 44,2 mg/dL) e de cloretos (G2: 110 mEq/L e G3: 109 mEq/L), e maiores concentrações de IgA (G3: 49,4 mg/dL), ceruloplasmina (G2: 30,1 mg/dL e G3: 46,9 mg/dL), transferrina (G2: 497 mg/dL), IgG-CP (G2: 1.307 mg/dL e G3: 1,152 mg/dL), IgG-CL (G2: 805 mg/dL e G3: 723 mg/dL), haptoglobina (G2: 52,5 mg/dL e G3: 40,2 mg/dL) e α_1 -glicoproteína ácida (G2: 37,7 mg/dL). Conclui-se que a utilização de ferramentas diagnósticas como o uso da caneca de fundo escuro, CMT e a CCS devem ser usadas em conjunto para a avaliação adequada da secreção láctea caprina e sempre que possível junto com o exame microbiológico. O *S. aureus* é o microorganismo mais isolado neste estudo sendo o 63,3% na secreção láctea das cabras do G2 e 75% do G3, predominando assim os agentes infecciosos contagiosos nas cabras avaliadas. O perfil bioquímico em especial de proteínas de fase aguda (PFA) do soro lácteo se mostrou melhor indicador clínico nos quadros de mastites clínica e subclínica que o perfil químico sanguíneo. Finalizando, ressalta-se que as proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da, foram identificadas somente no soro lácteo de cabras do G3, podendo ser considerado como um marcador de mastite clínica.

Palavras-chave: *Capra hircus*, glândula mamária, inflamação, proteinograma, SDS-PAGE

"BIOCHEMICAL PROFILE OF BLOOD SERUM AND MILK WHEY FROM GOATS UNDERGOING NATURALLY OCCURRING MASTITIS"

ABSTRACT - The study aimed to evaluate the changes in milk from goats with mastitis by using the strip cup test, California Mastitis Test (CMT), somatic cell count (SCC) and microbiological profile as well as to determine the biochemical profile, especially acute phase proteins, in blood serum and whey from goats with naturally occurring clinical or subclinical mastitis. Three experimental groups were formed by 30 mammary glands from healthy goats with milk samples negative to strip cup test, CMT and microbiological examination (control group – G1); 30 mammary glands with milk samples negative to strip cup test but with moderate (2+) or intense (3+) reaction in CMT and microbiological examination (group with subclinical mastitis – G2), and 12 mammary glands with positive results to strip cup test and microbiological examination (group with clinical mastitis – G3). After asepsis of the teats milk samples were collected for SCC, microbiological culture, and to determine the biochemical profile in whey, including proteinogram by fractionation in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). At the same time, blood samples were obtained to determine the serum biochemical profile. Automatic and microscopic methods were higher in milk samples from goats with subclinical mastitis (G2: 4,500,000 cells/mL e 20,830,000 cells/mL, respectively) e with clinical mastitis (G3: 7,500,000 células/mL e 39,100,000 cells/mL, respectively). *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS), Coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS), *Corynebacterium* spp. and *Streptococcus* spp. were the microorganisms isolated in milk samples from goats of G2 and G3. Whey samples from goats of G2 and G3 showed higher activity of alkaline phosphatase (G2: 122 U/L and G3: 207 U/L) and gamma-glutamyltransferase (G2: 483 U/L and G3: 571 U / L), and higher concentrations of albumin (G2: 0.18 g/dL and G3: 0.29 g/dL), total protein (G2: 1.50 g/dL and G3: 1.67 g/dL), chlorides (G2 190 mEq/L and G3: 202 mEq/L), iron (G2: 13.4 mg/dL and G3: 19.6 mg/dL), sodium (G2: 152 mMol/L and G3: 181 mMol/L), IgA (G2: 3.26 mg/dL and G3: 3.65 mg/dL), lactoferrin (G2: 111 mg/dL and G3: 127 mg/dL), IgG heavy chain IgG - IgG-HC (G2 : 94.9 mg/dL and G3: 144 mg/dL), IgG light chain - IgG-LC

(G2: 73.0 mg/dL and G3: 98.4 mg/dL), β -casein (G2: 2.13 mg/dL and G3: 3.89 mg/dL) and β -lactoglobulin (G2: 693 mg/ dL). Blood samples from goats of G2 and G3 had lower serum concentrations of urea (G2: 56.2 mg/dL and G3: 44.2 mg/dL) and chlorides (G2: 110 mEq/L and G3: 109 mEq/L), and higher concentrations of IgA (G3: 49.4 mg/dL), ceruloplasmin (G2: 30.1 mg/dL and G3: 46.9 mg/dL), transferrin (G2: 497 mg/dL), IgG-HC (G2: 1,307 mg/dL and G3: 1,152 mg / dL), IgG-LC (G2: 805 mg/dL and G3: 723 mg/dL), haptoglobin (G2: 52.5 mg/dL and G3: 40.2 mg/dL) and acid α 1-glycoprotein (G2: 37.7 mg/dL). In conclusion, The use of diagnostic tools such as the strip cup test, CMT and SCC should be used together for proper evaluation of goat milk secretion and whenever possible with the microbiological exam to aid the diagnostic . *S. aureus* was the most isolated microorganism in this study being 63.3 % and 75 % respectively from milk secretions from goats from G2 and G3 , being the predominating infectious contagious agents. The biochemical profile, in particular of acute phase proteins (APP) of whey serum is a best clinical indicator of clinical and subclinical mastitis than the blood chemical profile . Finally, it is noteworthy that the proteins of molecular weight of 39,000 Da and 19,000 Da, were only identified in whey serum from G3 goats and can be considered as a marker of clinical mastitis .

Keywords: *Capra hircus*, mammary gland, inflammation, proteinogram, SDS-PAGE

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias e desvio padrão da contagem automática de células somáticas (células x 10 ³ /mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) com mastite clínica (G3).....	22
Tabela 2. Médias e desvio padrão da contagem de células somáticas por microscopia direta (células x 10 ³ /mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	24
Tabela 3. Médias e desvio padrão das atividades enzimáticas e das concentrações de catabólitos, eletrólitos e minerais no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3)..	27
Tabela 4. Médias e desvio padrão das concentrações das frações proteicas no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	32
Tabela 5. Médias e desvio padrão das atividades enzimáticas e das concentrações de catabólitos, eletrólitos e minerais do soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	35
Tabela 6. Médias e desvio padrão das concentrações das frações proteicas no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	40

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Teste da caneca de fundo escuro, com presença de grumos no leite (setas).....	12
Figura 2.	<i>California Mastitis Test</i> (CMT). Ressalte-se os diferentes graus de gelatinização, característicos da reação positiva ao teste	13
Figura 3.	Confecção do esfregaço lácteo (A); etapas da coloração de Moats (B); esfregaço pronto para contagem microscópica direta (C e D).....	14
Figura 4.	Colônias de <i>S. aureus</i> em placa de Petri contendo ágar sangue.....	15
Figura 5.	Resultados do CMT do leite de cabras Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2)	21
Figura 6.	Contagem automática de células somáticas (células x 10 ³ /mL) no leite de cabras Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	23
Figura 7.	Contagem de células somáticas por microscopia direta (células x 10 ³ /mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	24
Figura 8.	Resultado do isolamento microbiológico no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	25
Figura 9.	Atividades enzimáticas e concentrações de catabólitos no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: fosfatase alcalina (U/L). B: gamaglutamiltransferase (U/L).	

	C: albumina (g/dL). D: proteína total (g/dL).....	28
Figura 10.	Concentrações de eletrólitos e minerais no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). E: cálcio total (mg/dL). F: fósforo (mg/dL). G: magnésio (mg/dL). H: cloretos (mEq/L). I: ferro (μ g/dL). J: sódio (mMol/L). K: potássio (mMol/L). L: cálcio ionizado (mMol/L).....	29
Figura 11.	Exemplo de traçado densitométrico das proteínas do soro lácteo de cabras sadias.....	30
Figura 12.	Concentrações das frações proteicas (mg/dL) do soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: imunoglobulina A. B: lactoferrina. C: albumina. D: imunoglobulina G de cadeia pesada. E: imunoglobulina G de cadeia leve. F: β -caseína. G: β -lactoglobulina. H: α -lactoalbumina.....	33
Figura 13.	Concentrações das proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da (mg/dL) no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa com mastite clínica (G3).....	34
Figura 14.	Atividades enzimáticas no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: aspartato aminotransferase (U/L). B: fosfatase alcalina (U/L). C: gamaglutamiltransferase (U/L). D: creatina quinase (U/L).....	36
Figura 15.	Concentrações de catabólitos no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). E: creatinina (mg/dL). F: albumina (g/dL). G: ureia (mg/dL). H: proteína total	

(g/dL).....	36
Figura 16. Concentrações séricas de eletrólitos e minerais no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). K: magnésio (mg/dL). L: cloretos (mEq/L). M: ferro ($\mu\text{g/dL}$). N: sódio (mMol/L). O: potássio (mMol/L). P: cálcio ionizado (mMol/L).....	37
Figura 17. Exemplo de traçado densitométrico das proteínas do soro sanguíneo de cabras sadias.....	38
Figura 18. Concentrações das frações proteicas do soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: imunoglobulina A. B: ceruloplasmina. C: transferrina. D: albumina. E: imunoglobulina G de cadeia pesada. F: imunoglobulina G de cadeia leve. G: haptoglobina. H: α_1 -glicoproteína ácida. I: proteína de peso molecular 33.000 Da. J: proteína de peso molecular 23.000 Da.....	41

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, sendo exercida em distintos ecossistemas e com os mais diferentes tipos de clima, solo, topografia e vegetação. O crescimento vertiginoso da exploração de pequenos ruminantes está transformando o cenário dos sistemas produtivos. Ao longo das últimas décadas a caprinocultura tem sofrido transformações técnicas nos diversos elos de suas cadeias produtivas.

Segundo a FAO (2015), o rebanho mundial de caprinos em 2014 era de 1.025.000 cabeças. A China tem o maior rebanho mundial, com 185 milhões de cabeças, representando 18 % do efetivo mundial, seguida de Índia com 134.000.000 e Nigéria com 70.699.219. O Brasil ocupa a 20ª posição, com um rebanho de 8.851.879 caprinos, o que corresponde a cerca de 0,87 % do rebanho mundial.

Nas últimas três décadas houve um significativo aumento na criação de pequenos ruminantes no Brasil. Essa atividade agropecuária que antes se restringia praticamente à região Nordeste, hoje se encontra em processo de expansão em outras regiões do país (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

A qualidade do leite é diretamente influenciada pelo manejo nutricional e sanitário dos animais, além da manutenção e limpeza adequada dos equipamentos e utensílios utilizados desde a ordenha ao transporte até a indústria. O leite caprino é importante para a alimentação humana e considerado um substituto do leite bovino nos casos de intolerância láctea. Apesar de sua importância como alimento, pode veicular uma série de microrganismos patogênicos aos seres humanos (LANGONI et al., 2012).

No entanto, um fator limitante à produção leiteira é a presença da mastite que tem como principal agente etiológico bacteriano o *Staphylococcus aureus* (AIRES de SOUSA et al., 2007). Para a prevenção da mastite, os estudos epidemiológicos são relevantes, sendo o ponto de partida para a adoção de medidas sanitárias na propriedade. Dentre os principais fatores condicionantes da mastite estão: resistência natural da glândula mamária, fase da lactação, hereditariedade, idade do animal, estado nutricional, espécie, potencial patogênico do agente etiológico, manejo e fatores ambientais. O manejo geral e da ordenha, principalmente no que

se refere às atividades de higiene do local, do animal e do ordenhador, merecem atenção especial em função da capacidade de disseminação dos microrganismos no rebanho. Outro fator determinante inclui o estado fisiológico, já que no período de lactação há maior suscetibilidade do animal à mastite contagiosa, enquanto no período seco há maior frequência de mastite ambiental (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

A mensuração das proteínas de fase aguda (PFA) em programas de vigilância sanitária dos rebanhos tem sido sugerida não só para a identificação de animais com doenças clínicas, mas também como um meio de detectar animais com doenças subclínicas. O recente reconhecimento da importância da mensuração das PFA nos rebanhos acometidos por mastite bacteriana de modo a diagnosticar precocemente esta doença é de grande importância econômica na indústria leiteira, especialmente nos sistemas de ordenha automática (ECKERSALL, 2004). No entanto, González et al. (2008) ressaltam a necessidade de estudos adicionais na espécie caprina, inclusive a obtenção de valores de referência fisiológicos para os diversos tipos de rebanho e de sistemas de manejo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O leite caprino possui características nutricionais importantes, como fácil digestibilidade, alcalinidade e capacidade de tamponamento, condições que o qualifica como alimento de valor terapêutico na nutrição humana. Tem sido utilizado como base para alimentos medicinais e para a alimentação de crianças (SILANIKOVE et al., 2010). Sua composição varia de acordo com raça, condições ambientais, fase de lactação, tipo de alimentação, manejo, ciclo estral, estado de higidez, idade, quantidade de leite produzido e fisiologia individual da cabra (ALVES; PINHEIRO, 2004).

Um fator limitante na indústria caprina é a ocorrência de doenças. Dentre elas, a que causa grandes perdas econômicas na cadeia produtiva do leite é a mastite. Esta enfermidade caracteriza-se por alterações físicas, químicas e comumente bacteriológicas no leite, bem como alterações patológicas no tecido mamário. A detecção e o tratamento precoces são importantes para limitar a lesão ao tecido mamário e reduzir as perdas na produção do leite (SHEARER; HARRIS Jr, 2003).

São reconhecidos dois tipos de mastite, a clínica e a subclínica ou inaparente. A primeira caracteriza-se por anormalidades visíveis no úbere e no leite, tais como coágulos, flocos ou modificação da cor da secreção. Na mastite clínica aguda verifica-se dor, hipertermia, hiperemia do úbere, além de alterações na secreção láctea (SHEARER; HARRIS Jr, 2003). Com frequência, nota-se aumento das concentrações de proteínas, sódio e cloreto e diminuição nos teores de gordura, sólidos totais, caseína, lactose, cálcio, fósforo e potássio (HAENLEIN, 2004).

A mastite subclínica, pode ser detectada por meio da contagem de células somáticas no leite (CCS), ou seja, células de descamação do epitélio glandular secretor e leucócitos de origem sanguínea. Quando há lesão ou infecção do tecido mamário ocorre aumento significativo da CCS (SHEARER; HARRIS, 2003).

A mastite pode ser também classificada, em função do agente etiológico, em contagiosa e ambiental. Na mastite contagiosa, os agentes causadores necessitam do animal para sua sobrevivência, pois se multiplicam na glândula mamária, no canal do teto ou na pele. A transmissão ocorre de um animal infectado para outro

sadio, principalmente durante a ordenha; é causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.* *E. coli*iformes (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002; CORRALES ET AL., 1997). Já a mastite ambiental é causada por microrganismos que vivem preferencialmente no habitat do animal, em locais onde há fezes, urina, lama e matéria orgânica em geral (FREITAS et al., 2005). Os patógenos mais comumente envolvidos são coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*) e estreptococos ambientais (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) (FONSECA; SANTOS, 2001). Bergonier et al. (2003) verificam maior prevalência de *S. aureus* nas mastites, de cabras e ovelhas, além de, em ordem decrescente de frequência, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus spp.*, enterobactérias, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacteria*, *Pasteurella* e *Pseudomonas spp.* Segundo Contreras et al. (2001) e Santos et al. (2007), na maioria dos rebanhos são detectadas quatro principais espécies de estreptococos: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis*, geralmente causadores de mastite clínica.

Langoni et al. (2012) relataram que *S. aureus* foi o patógeno de maior ocorrência (34,6%), seguido de *S. epidermidis* (26%), *S. caprae* (25%), *S. dysgalactiae* (6,7%), *Corynebacterium bovis* (2,9%), *Streptococcus uberis* (1,9%), *Escherichia coli* (1,9%) e *Micrococcus spp.* (1%). Além da múltipla etiologia, característica das mastites, os pesquisadores notaram diferentes percentuais dos patógenos isolados nas propriedades estudadas, aspecto relevante na epidemiologia desta infecção.

As perdas econômicas resultantes das mastites são extremamente elevadas nos rebanhos leiteiros de pequenos ruminantes. A diminuição da produção e a baixa qualidade de leite, os gastos com assistência veterinária e o descarte de leite são fatores relacionados à perda econômica. Os riscos ao consumidor não se limitam à presença de patógenos no leite, os quais podem ser destruídos mediante tratamento térmico adequado, mas resultam também das toxinas termoestáveis, que persistem nos produtos lácteos, mesmo após pasteurização e esterilização (CONTRERAS et al., 2001).

Algumas cepas de *S. aureus* são responsáveis pela ocorrência de mastite subclínica; este patógeno é, também, uma das principais causas de mastite clínica em cabras, com taxa de prevalência de 5,6% a 17,0%, semelhante à relatada em vacas (AIRES DE SOUSA et al., 2007; KIFARO; MOSHI; MINGA, 2009); pode causar mastite aguda gangrenosa grave. Este tipo de mastite pode levar o animal a óbito e, caso não seja instituído tratamento efetivo imediato, há sério risco de perda da glândula infectada em razão da necrose tecidual. A alta prevalência de mastite causada por *S. aureus* está relacionada à capacidade da bactéria em produzir exopolissacarídeos que contribuem para a lesão tecidual e formam uma barreira protetora que limita a eficácia tanto da resposta imune quanto da terapia antimicrobiana. Portanto, em alguns casos, recomenda-se o descarte do animal, pois sua permanência no rebanho pode representar risco sanitário tanto para os consumidores de leite quanto para o restante dos animais (CONTRERAS et al., 1995). Além disso, as enterotoxinas produzidas pelas cepas de *S. aureus* são termoestáveis e têm papel importante na ocorrência de doenças de origem alimentar, mesmo se o leite consumido é pasteurizado (CONTRERAS et al., 2007).

Outra doença que gera perdas econômicas na produção de leite é a síndrome artrite encefalite caprina (CAE) que é uma doença infecciosa, geralmente progressiva crônica degenerativa, de alta prevalência nos rebanhos caprinos nacionais (ANDRIOLI et al., 2007). A doença apresenta ampla distribuição mundial e está incluída na lista de doenças de notificação obrigatória estabelecida pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health – OIE*, 2012).

O agente etiológico é um vírus RNA do gênero Lentivirus família Retroviridae e subfamília Lentivirinae. Os animais infectados são a fonte de infecção. A transmissão do vírus entre os caprinos ocorre mais comumente pela ingestão de colostro e leite contaminados, além do contato com secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário, como secreções respiratória e urogenital, fezes, saliva e leite contaminado (OIE, 2012).

A infecção pelo vírus da CAE geralmente é subclínica e persistente, podendo causar doença multissistêmica, geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso, debilidade e, até mesmo morte do animal. As

manifestações clínicas descritas compreendem a forma mamária, respiratória, artrítica e nervosa (OIE, 2012).

Para o controle da mastite caprina é importante que exista um programa voltado para o diagnóstico e constante monitoramento do rebanho e da propriedade (CHAPAVAL; PIEKARSKI, 2000). O diagnóstico da inflamação da glândula mamária inicia com a inspeção e palpação do úbere, para detectar anormalidades, como nódulos localizados ou difusos no parênquima, consistência endurecida da glândula e aumento da temperatura local. Também, é necessário realizar a inspeção do leite, por meio do uso da caneca telada ou de fundo escuro, a fim de visualizar alterações macroscópicas como grumos, flocos de pus e ou sangue. Nas formas agudas é possível notar febre súbita (40°C a 42°C), inapetência, apatia, dispnéia e decúbito (MOTA, 2008).

O *California Mastitis Test* (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957), apesar de subjetivo, tem a vantagem de ser um teste de campo prático, que estima o número de células somáticas no leite e a sanidade da glândula mamária (FAGLIARI; LUCAS; FERREIRA NETO, 1990).

Uma forma menos rápida, porém importante de avaliar a qualidade do leite, é a contagem de células somáticas (CCS). O termo células somáticas do leite é utilizado para designar todas as células presentes na secreção láctea, principalmente leucócitos e células do epitélio glandular, eliminadas fisiologicamente no leite durante o curso normal da lactação. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, pela Instrução Normativa N° 37 de 31 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), estabeleceu requisitos mínimos de qualidade do leite destinado ao consumo humano fixados no Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra, mas não há limites de valores definidos para a CCS. No momento, o valor de 1.000.000 células/mL é o limite regulamentado para rebanhos tipo A nos Estados Unidos da América (EUA). Esforços têm sido realizados para reduzir o atual padrão americano da CCS do leite de cabra de 1.000.000 células/mL para 750.000 células/mL (SOUZA et al., 2007). Segundo a Instrução Normativa 62, que entrou em vigor em 1° de janeiro de 2012, o limite máximo de CCS no leite bovino até 30/06/2014 é de 500.000 células/mL nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. (BRASIL, 2011).

A particularidade da secreção láctea caprina ser do tipo apócrina, na qual junto com a secreção láctea é eliminado parte do citoplasma, difere da secreção merócrina dos bovinos, levando a erros de interpretação durante a realização de técnicas de avaliação da celularidade do leite de fêmeas desta espécie. A contagem microscópica direta de células somáticas é o método quantitativo mais confiável para a determinação da celularidade do leite de cabras quando comparado aos métodos automático ou qualitativo (CMT) de contagem celular (MADUREIRA et al., 2010). Entretanto, como ocorre redução significativa da quantidade de células somáticas entre o primeiro e o segundo dia de armazenamento da amostra de leite, como consequência da perda de integridade celular e da fragmentação, a CCS pelo método microscópico deve ser realizada nas primeiras 24 horas após a colheita da amostra (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971).

Proteínas de fase aguda (PFA) são consideradas indicadores mais confiáveis da resposta sistêmica frente a processos inflamatórios e infecciosos, quando comparadas a outras variáveis, como hipertermia e leucocitose com neutrofilia. Contrastando com análises hematológicas, que são regularmente recomendadas como técnicas auxiliares de diagnóstico, as PFA são estáveis e as mensurações podem ser realizadas em amostras previamente congeladas. Além disto, são úteis no diagnóstico de inflamação em animais com supressão ou depleção da função medular (JAIN, 1993).

Estas proteínas são um grupo de glicoproteínas produzidas principalmente no fígado, sob estímulo de citocinas específicas liberadas por leucócitos e macrófagos, cujas concentrações plasmáticas se elevam rapidamente durante a inflamação (SINGH; PACHAURI, 2002). De modo geral, o estímulo à síntese de PFA ocorre 6 a 8 horas após a lesão, com concentração máxima depois de 2 a 5 dias. Porém, o pico e a persistência das concentrações plasmáticas das PFA dependem do metabolismo, do extravasamento vascular e da deposição tecidual (JAIN, 1993). As proteínas cujos teores séricos se elevam 25% ou mais, em resposta às citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a inflamação, são denominadas PFA positivas. Neste grupo incluem-se ceruloplasmina, fibrinogênio, proteína C-reativa, antitripsina e haptoglobina. Por outro lado, aquelas cujas concentrações séricas diminuem frente ao mesmo tipo de estímulo inflamatório/infeccioso são denominadas PFA negativas,

a exemplo de pré-albumina, albumina e transferrina (KANEKO et al., 2008; ECKERSALL; BELL, 2010).

Na medicina humana, e cada vez mais na medicina veterinária, o monitoramento das concentrações plasmáticas destas proteínas tem fornecido valiosas informações sobre as enfermidades que cursam com inflamação, podendo ser útil não apenas para o diagnóstico, mas também para monitorar a progressão da doença e avaliar a resposta à terapia (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). Vários estudos mostram que as diferentes PFA se comportam de modo distinto frente aos diversos tipos de inflamação, e que há também variações na resposta de fase aguda entre as diferentes espécies animais (JAIN, 1993). A síntese proteica é estabelecida geneticamente, o que explica a variabilidade entre espécies e indivíduos e que são refletidas no padrão do perfil eletroforético das proteínas séricas em situação fisiológica (KANEKO et al., 2008).

A mensuração das PFA nos programas de vigilância sanitária de rebanhos tem sido sugerida não só para identificação individual dos animais com doenças clínicas, mas principalmente como um meio de identificação de animais com doenças subclínicas (ECKERSALL, 2004), assegurando a saúde dos animais antes que sejam destinados ao consumo humano (SAINI; WEBERT, 1991). Eckersall (2004) relatou a importância da mensuração das PFA no diagnóstico precoce da mastite bacteriana e Grönlund; Sandgren; Waller (2005) ressaltaram que doenças inflamatórias subclínicas, ou inaparentes também podem induzir aumento nas concentrações de PFA

A concentração circulante destas proteínas está relacionada à gravidade da doença e, portanto, sua quantificação propicia prontamente um meio de avaliar a presença e a extensão da inflamação (ECKERSALL, 2000; O'MAHONY et al., 2006). Matos (2005) verificou que fatores como idade, sexo e raça não influenciaram as concentrações séricas de PFA em cordeiros e ovelhas nos períodos de pré-parto e de lactação.

Apesar do valor clínico que as determinações de PFA poderiam ter na clínica médica veterinária de caprinos, há pouca informação disponível na literatura científicos sendo necessários estudos mais expressivos (GONZÁLEZ et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os principais indicadores de qualidade do leite e o perfil bioquímico sanguíneo e lácteo de cabras com mastite de ocorrência natural.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar as alterações da secreção láctea mediante o uso do teste da caneca do fundo escuro, do *California Mastitis Test* e contagem de células somáticas.
- Investigar a etiologia e a ocorrência de mastite clínica ou subclínica em cabras.
- Determinar o perfil bioquímico, em especial de proteínas de fase aguda (PFA), dos soros sanguíneo e lácteo de cabras com mastite clínica ou subclínica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP / Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 013399 / 14).

4.1 Propriedade e animais

Durante os meses de abril a dezembro de 2013, foram acompanhadas duas lactações completas (180 dias cada) de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa pertencentes a uma propriedade rural localizada no município de São José do Rio Preto – SP, com instalações adequadas para a exploração de caprinos leiteiros.

O rebanho era constituído por aproximadamente 400 caprinos das raças Saanen e Alpina Francesa, mantidos em regime intensivo de criação, alimentados com silagem de milho, capim tifton triturado e ração comercial balanceada. Cem cabras estavam em lactação, sendo ordenhadas mecanicamente uma vez ao dia, com produção diária média de 100 kg de leite. A sala de ordenha era do tipo com fosso em ala simples. Antes da ordenha era realizada a antissepsia dos tetos por imersão em solução de iodo a 0,25% e secagem com papel toalha descartável. Após a ordenha fazia-se a imersão dos tetos em solução de iodo a 0,5%.

4.2 Grupos experimentais

Foram selecionadas 72 metades mamárias distribuídas da seguinte forma:

G1 – Grupo controle: 30 metades mamárias de cabras sadias, com secreção láctea negativa na prova da caneca de fundo escuro, no *California Mastitis Test* (CMT) e no exame microbiológico.

G2 – Grupo mastite subclínica: 30 metades mamárias com secreção láctea negativa na prova da caneca de fundo escuro, com reação moderada (2+) ou intensa (3+) no CMT e exame microbiológico positivo.

G3 – Grupo mastite clínica: 12 metades mamárias com secreção láctea positiva na prova da caneca de fundo escuro e exame microbiológico positivo.

4.3 Exame clínico da glândula mamária

Após a ordenha foi realizado exame clínico da glândula mamária por meio de inspeção e palpação, segundo as recomendações de Pugh (2005).

4.4 Colheita e preparo das amostras de secreção láctea e de sangue

As amostras de secreção láctea e de sangue foram colhidas entre o primeiro e o sexto mês de lactação. Antes de cada colheita, a secreção láctea foi avaliada por meio da prova da caneca de fundo escuro e do *California Mastitis Test* (CMT). Em seguida, foi realizada antissepsia do teto com solução de álcool 70% e realizada a colheita de amostras de leite para contagem de células somáticas (CCS), cultura microbiológica e determinação do perfil bioquímico do soro lácteo.

Para a contagem automática das células somáticas, foi colhida uma amostra de 30 mL de leite em frasco estéril contendo bronopol como conservante. Para a contagem de células somáticas por microscopia direta foi colhida uma segunda amostra de leite em frasco estéril sem conservante, mantida à temperatura ambiente, para confecção de esfregaço lácteo.

Para a análise microbiológica foram obtidas, assepticamente, amostras de 15 mL de leite de cada metade mamária. Essas alíquotas foram mantidas refrigeradas a -4°C até o momento da realização do exame microbiológico.

O soro lácteo, usado para a análise do perfil bioquímico e eletroforese, foi obtido submetendo-se as amostras de leite à coagulação pela adição de 5% de solução de renina seguida de centrifugação, segundo técnica sugerida por Sant'Ana e Birgel (2003). O soro lácteo foi congelado à temperatura de -20°C até o momento dos exames laboratoriais.

As amostras de sangue para diagnóstico da CAE, e obtenção do perfil bioquímico e eletroforese sérica, foram colhidas mediante punção jugular, com agulha 25x8 mm apropriadas para tubos a vácuo, sendo obtidos 8 mL de cada animal, em tubo sem anticoagulante. Após retração do coágulo e centrifugação das amostras, as alíquotas de soro sanguíneo foram acondicionadas em freezer a -20°C , para posterior análise laboratorial. Uma das alíquotas de soro sanguíneo de

cada um dos animais foi submetida à sorologia para avaliação da presença do vírus da CAE, pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), segundo as recomendações de Crawford e Adams (1981), que utilizaram como antígeno a proteína do capsídeo p28 do vírus da CAE.

4.4.1 Teste da caneca de fundo escuro e *California Mastitis Test* (CMT)

O teste da caneca de fundo escuro foi realizado antes da ordenha, após desprezar os três primeiros jatos de leite, a fim de avaliar o aspecto da secreção láctea (Figura 1).



Figura 1. Teste da caneca de fundo escuro, com presença de grumos no leite (setas).

Em seguida foi realizado o CMT. Para tal foi utilizado detergente aniônico neutro e o resultado foi avaliado em função do grau de gelatinização da mistura de partes iguais de leite e reagente, segundo recomendação de Philpot e Nickerson (1991). De acordo com a viscosidade da solução a intensidade da reação foi classificada em negativa (-), leve (1+), moderada (2+) ou intensa (3+) (Figura 2).

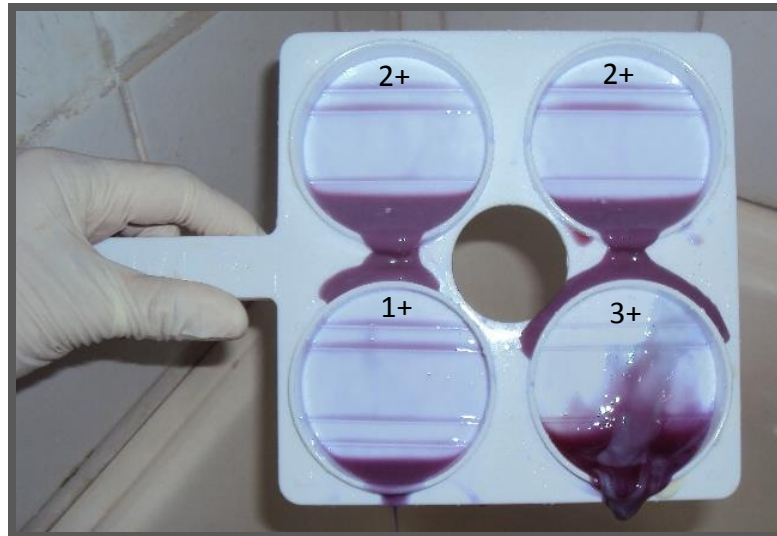


Figura 2. *California Mastitis Test (CMT)*. Ressalte-se os diferentes graus de gelatinização, característicos de reação positiva ao teste.

4.5 Exames laboratoriais da secreção láctea

4.5.1 Contagem de células somáticas (CCS)

4.5.1.1 Contagem automática

A contagem automática de células somáticas foi efetuada pela metodologia de citometria de fluxo no equipamento Somacount 300, calibrado com leite de vaca, de acordo com recomendações da *International Dairy Federation* (IDF, 1995).

4.5.1.2 Contagem por microscopia direta

Para a contagem de células somáticas por microscópica direta, 10 μL de leite foram distribuídos em uma área de 1 cm^2 , em lâminas de microscopia, previamente limpas e desengorduras, confeccionadas em duplicata para cada amostra de leite. A seguir, os esfregaços foram secos em temperatura ambiente, por 24 horas segundo o método microscópico descrito por Prescott e Breed (1910) e posteriormente realizada a coloração de Moats (Figura 3).

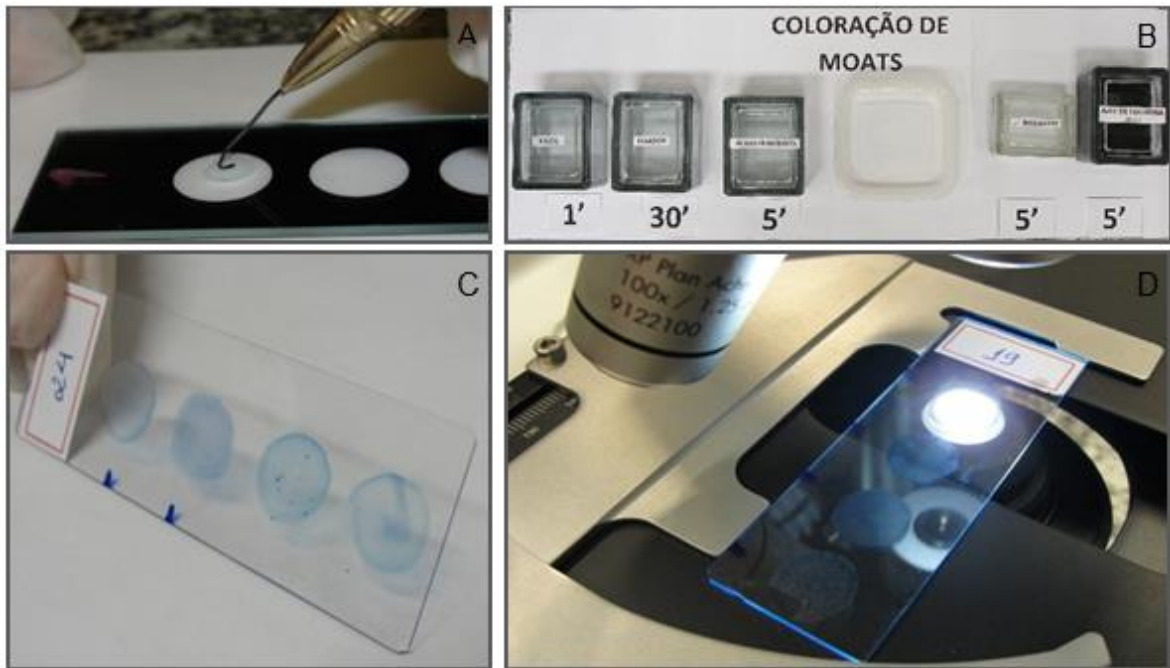


Figura 3. Confeção do esfregaço lácteo (A); etapas da coloração de Moats (B); esfregaço pronto para contagem microscópica direta (C e D).

4.5.2 Exame microbiológico

Alíquotas de 10 μ L de cada amostra de leite foram semeadas em placas de Petri com ágar contendo 5% de sangue ovino desfibrinado (Laborclin) (Figura 4), ágar manitol salgado (Oxoid, CM0085), ágar MacConkey (Oxoid, CM0115), incubadas à 37°C por 48 horas e em ágar Sabouraud (Oxoid, CM0041), incubadas à 37°C por 72 horas (QUINN et al., 2005). Os microrganismos foram identificados segundo as características morfotintoriais, bioquímicas e de cultivo (QUINN; CARTER; MARKEY, 1994; QUINN et al., 2005; TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005; TRABULSI; ORDOÑEZ; MARTINEZ, 2005).

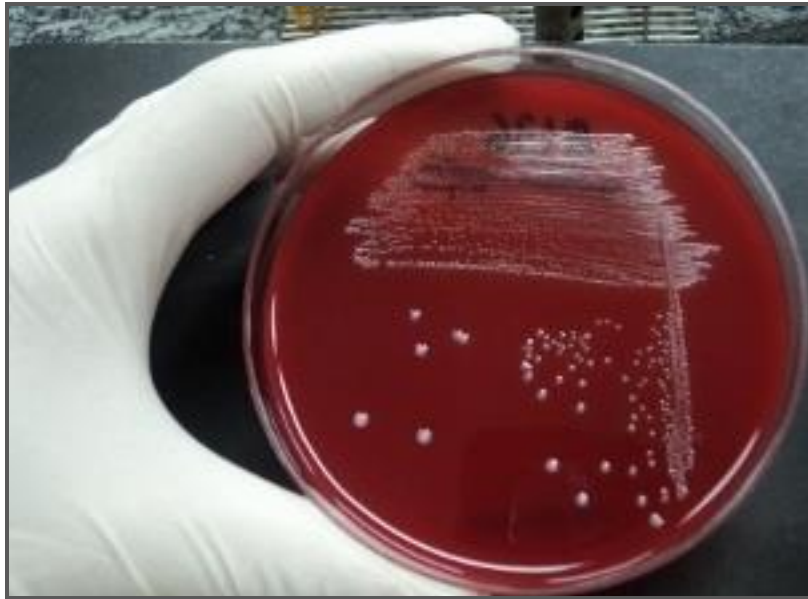


Figura 4. Colônias de *S. aureus* em placa de Petri contendo ágar sangue.

4.5.3 Determinação do perfil bioquímico

Nas amostras de soro lácteo foram determinadas as atividades das enzimas gamaglutamiltransferase (método de Szasz modificado), fosfatase alcalina (método de Bowers e McComb modificado), bem como as concentrações de proteína total (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol), cálcio total (método de CPC), fósforo (método de Daly e Ertinghausen modificado), magnésio (método Labtest), cloretos (método Labtest) e ferro (método de Goodwin modificado), utilizando-se conjunto de reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático, com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste (Labquest). Adicionalmente foram determinados os teores de cálcio ionizado, sódio e potássio, pelo método seletivo de íons em analisador automático (9180 Electrolyte Analyzer). Quando necessário, foram realizadas diluições das amostras em água destilada.

4.5.5 Eletroforese do soro lácteo em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A separação das frações proteicas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após fracionamento das proteínas, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída de: metanol - 50,0%; água - 40,0%; ácido acético glacial - 9,75% e azul de coomassie - 0,25%. Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS-9301PC). Como referência foi utilizada uma solução marcadora (Sigma-Aldrich) com pesos moleculares 14.200, 20.000, 24.000, 29.000, 36.000, 45.000, 55.000, 66.000, 97.000, 116.000 e 200.000 dáltons (Da), além das proteínas purificadas (Sigma-Aldrich) IgG, lactoferrina, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e β -caseína.

4.6 Exames laboratoriais do soro sanguíneo

4.6.1 Determinação do perfil bioquímico

Nas amostras de soro sanguíneo foram determinadas as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (método cinético UV-IFCC), fosfatase alcalina (método de Bowers e McComb modificado), gamaglutamiltransferase (método de Szasz modificado), creatina quinase (método IFCC), bem como as concentrações de creatinina (método Labtest), albumina (método do verde de bromocresol), ureia (método enzimático UV), proteína total (método do biureto), cálcio total (método de CPC), fósforo (método de Daly e Ertinghausen modificado), magnésio (método Labtest), cloretos (método Labtest) e ferro (método de Goodwin modificado), utilizando-se conjunto de reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático, com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste (Labquest). Adicionalmente foram

determinados os teores de cálcio ionizado, sódio e potássio, pelo método seletivo de íons em analisador automático (9180 Electrolyte Analyzer).

4.6.2 Eletroforese do soro sanguíneo em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A separação das frações proteicas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após fracionamento das proteínas o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída de: metanol - 50,0%; água - 40,0%; ácido acético glacial - 9,75% e azul de coomassie - 0,25%. Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS-9301PC). Como referência foi utilizada uma solução marcadora (Sigma-Aldrich) com pesos moleculares 14.200, 20.000, 24.000, 29.000, 36.000, 45.000, 55.000, 66.000, 97.000, 116.000 e 200.000 dáltons (Da), além das proteínas purificadas (Sigma-Aldrich) IgG sérica, transferrina, α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas e as comparações de médias pelo teste de Tukey, após a verificação da homogeneidade das amostras com o auxílio do programa estatístico computadorizado SAS (versão 9.1.3). Para as variáveis albumina, ferro, IgA e β -caseína do soro lácteo e da proteína de 30.000 Da do soro sanguíneo, empregou-se análise de variância não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para a comparação entre os pares de médias, com emprego do programa estatístico GrafPad Prism (versão 4.0). A significância foi verificada a 5% de probabilidade (ZAR, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental foram avaliadas 374 metades mamárias de 210 animais, sendo selecionadas 30 metades mamárias para o grupo controle (G1), 30 metades mamárias para o grupo com mastite subclínica (G2) e 12 metades mamárias para o grupo com mastite clínica (G3). O menor número de metades mamárias selecionadas para compor o G3 deveu-se à baixa frequência de casos de mastite clínica de ocorrência natural na propriedade.

Os resultados da sorologia para avaliação da presença do vírus da CAE mostraram que no grupo controle (G1), 28 cabras (93,3%) foram soropositivas e duas (6,67%) foram soronegativas para CAE; no grupo com mastite subclínica (G2), 23 cabras (76,7%) foram soropositivas e sete (23,3%) soronegativas; e no grupo com mastite clínica (G3), 11 cabras (91,7%) foram soropositivas e uma (8,33%) soronegativa. Em concordância com estes resultados Melo e Franke (1997), relataram que o vírus da CAE apresenta alta prevalência na caprinocultura leiteira, onde o regime de criação intensiva e a proximidade dos animais favorece a disseminação da doença. No entanto a prevalência encontrada neste estúdio foi superior à relatada por Lara et al. (2013) onde demonstraram que a ocorrência de animais soropositivos para CAE nos rebanhos caprinos no estado de São Paulo varia entre 26,3% a 43,0%.

5.1 Exame da glândula mamária

O exame clínico das metades mamárias das cabras do grupo controle (G1) e do grupo com mastite subclínica (G2) não indicou nenhuma alteração. Por outro lado, o exame clínico da glândula mamária das cabras com mastite clínica (G3) revelou: aumento de linfonodos (n=1), presença de nódulos localizados ou difusos (n=3), consistência endurecida (n=2), sensibilidade dolorosa, aumento de temperatura local (n=2) e assimetria da glândula mamária (n=2). Estes achados ilustram a importância do exame clínico do úbere, como já foi demonstrado em estudo realizado por Deinhofer e Pernthaner (1995), que classificaram glândulas mamárias como “mastíticas” quando eram detectados variados graus de alterações

patológicas, como atrofas e micro ou macronodulações. Ainda, Marogna et al. (2012), comparando os achados clínicos de um capril leiteiro com os resultados microbiológicos, concluíram que cabras com alterações clínicas na glândula mamária apresentam uma probabilidade 3,71 vezes maior de apresentar resultado positivo na cultura bacteriana comparado a cabras sem nenhum sinal clínico.

5.2 Secreção láctea

5.2.1 Teste da caneca de fundo escuro

Não foram observadas alterações macroscópicas nas amostras de secreção láctea das cabras sadias (G1) e com mastite subclínica (G2). Por outro lado, foi constatada a presença de grumos de diferentes tamanhos em todas as amostras de secreção láctea das cabras com mastite clínica (G3).

5.2.2 California Mastitis Test (CMT)

Todas as amostras de secreção láctea de cabras sadias (G1) apresentaram reação negativa ao CMT. No grupo de cabras com mastite subclínica (G2), 20 amostras (66,6%) apresentaram reação moderada (2+) e 10 amostras (33,3%) apresentaram reação intensa (3+) (Figura 5).

Em concordância com estes achados Bergonier et al. (2003) e Shaeren; Maurer (2006) afirmam que a utilização do CMT não seja confiável quando usado isoladamente no diagnóstico da inflamação intramamária em cabras, devido ao tipo de secreção apócrina da glândula mamária de cabra que permite a presença de células epiteliais, em maior quantidade, quando comparada ao leite de vaca. Contreras et al., 2013, ressaltam que o teste deve ser interpretado em associação à contagem de células somáticas e culturas bacteriológicas no leite. Outros estudos, relatam que o teste pode ser útil na detecção de glândulas mamárias saudáveis (KARZIS; DONKIN; PETZER, 2007; PETZER et al., 2008; SREEJA et al., 2013) e não na constatação da infecção. A principal vantagem do CMT é que é um método rápido, de fácil execução e barato.

Vale salientar que o CMT e a CCS no leite caprino devem ser utilizados em conjunto e, se possível, associados a métodos diretos, como a cultura bacteriana, para correta interpretação dos resultados (PATERNA et al., 2014).

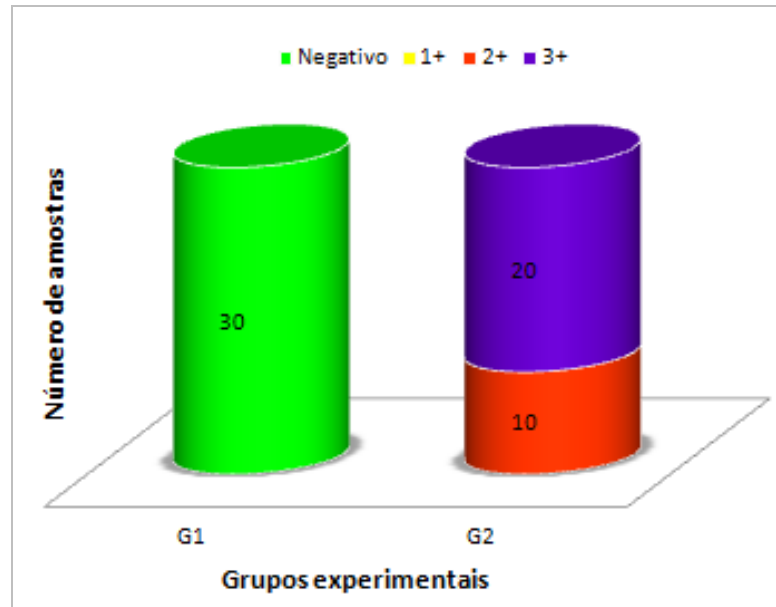


Figura 5. Resultados do CMT do leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2).

5.2.3 Contagem de células somáticas (CCS)

O leite de cabras comparativamente ao leite de vacas apresenta CCS fisiologicamente elevada, que aumenta ainda mais no final da lactação, mesmo na ausência de infecção intramamária, e com o número de partos. Dessa forma, os valores de referência estabelecidos para a CCS do leite bovino não devem ser utilizados para o leite caprino (PERSSON; OLOFSSON, 2011).

5.2.3.1 Contagem automática

Nas cabras do grupo controle (G1) as contagens de células somáticas (CCS) obtidas em contador automático variaram de 55.000 células/mL a 463.000 células/mL, com valor médio de 182.000 células/mL. Nas cabras com mastite

subclínica (G2) a variação foi de 861.000 células/mL a 9.999.000 células/mL, com valor médio de 4.500.000 células/mL e nas cabras com mastite clínica (G3) a variação foi de 3.260.000 células/mL a 9.999.000 células/mL, com valor médio de 7.500.000 (Tabela 1 e Figura 6).

Sabe-se que vários fatores, fisiológicos ou não, podem afetar a contagem de células somáticas, tais como; número de lactações, idade do animal, fase da lactação e ocorrência de infecções intramamárias (MADUREIRA et al., 2010). Mas a CCS é utilizada principalmente como um indicador de mastites subclínicas, sendo que altas contagens podem estar associadas com diminuição na produção e prejuízo na qualidade do leite (LANGONI et al., 2012).

A contagem automática de células somáticas pode ser realizada em contadores de partículas (Coulter Count) ou contadores baseados em citometria de fluxo (Fossomatic ou Somacount). Entretanto, o primeiro método não é recomendado para a CCS do leite caprino, pois como ele é baseado na contagem de impulsos elétricos, há influência da quantidade de glóbulos de gordura e partículas citoplasmáticas, resultando em contagens muito elevadas (MADUREIRA et al., 2010).

E apesar de ainda não existirem padrões estabelecidos para a CCS no leite caprino, em geral, a CCS no leite de cabras livres de infecções intramamárias é inferior a 400.000 células/mL (McDOUGALL et al., 2001), no entanto, não é rara a ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 células/mL (ZENG, 1996).

Tabela 1. Médias e desvio padrão da contagem automática de células somáticas (células x 10³/mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1) com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Grupos	Contagem de células somáticas (células x 10³/mL)
G1	182 ± 64 ^A
G2	4.500 ± 1.100 ^B
G3	7.500 ± 1.800 ^C

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

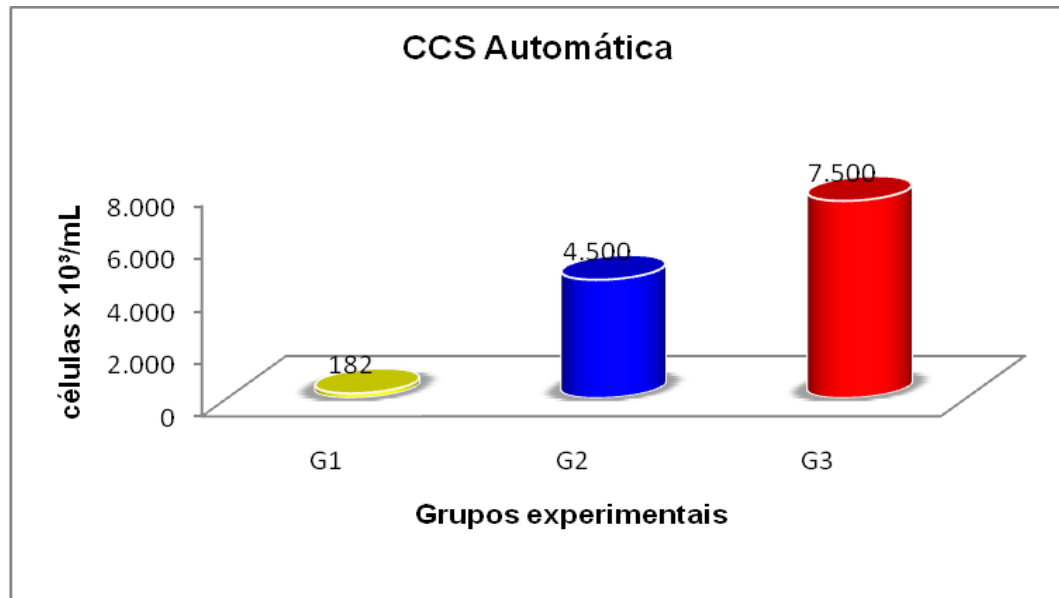


Figura 6. Contagem automática de células somáticas (células x 10³/mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

5.2.3.2 Contagem por microscopia direta

Os valores da CCS por microscopia direta encontrados no grupo de cabras sadias (G1) variaram de 53.000 células/mL a 459.000 células/mL, com valor médio de 190.000 células/mL. No grupo de cabras com mastite subclínica (G2) os valores da CCS variaram de 1.200.000 células/mL a 34.000.000 células/mL, com valor médio de 20.830.000 células/mL e no grupo de cabras com mastite clínica (G3) os valores variaram de 4.500.000 células/mL a 113.000.000 células/mL, com valor médio de 39.100.000 células/mL (Tabela 2 e Figura 7).

A contagem microscópica direta é um dos métodos mais confiáveis para a determinação do número de células somáticas no leite caprino, principalmente se forem utilizados corantes específicos de DNA, como a coloração verde de metil e pirona-Y, que diferencia as células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos, cujas dimensões e morfologia são semelhantes aos leucócitos (ZENG et al., 1999). Entretanto, contagens mais elevadas são observadas quando são utilizados corantes não específicos para DNA, uma vez que as partículas citoplasmáticas podem erroneamente serem contadas como células (DULIN et al., 1982). Sendo

possivelmente está a razão pela qual as contagens por microscopia direta foram tão altas em comparação com outros estudos.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da contagem de células somáticas por microscopia direta (células x 10³/mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Grupos	CCS Microscopia direta (células x 10 ³ /mL)
G1	190 ± 70 ^A
G2	20.830 ± 19.400 ^B
G3	39.110 ± 4.410 ^C

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

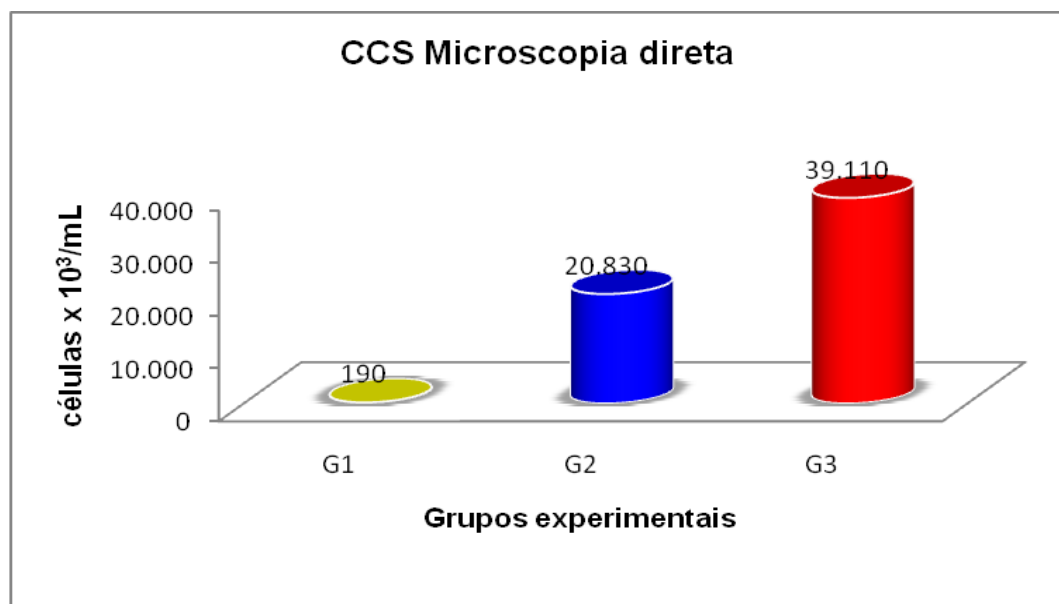


Figura 7. Contagem de células somáticas por microscopia direta (células x 10³/mL) no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

5.2.4 Exame microbiológico

Não se constatou crescimento de microrganismo nas amostras de leite das cabras do grupo controle (G1). Nas amostras de secreção láctea do grupo das cabras com mastite subclínica (G2), foram isolados *S. aureus* (n=19; 63,3%), SCP (n=7; 23,3%), *Corynebacterium* spp. (n=3; 10,0%) e SCN (n=1; 3,33%) (Figura 8). Nas amostras de leite do grupo de cabras com mastite clínica (G3) foram isolados: *S. aureus* (n=9; 75,0%), SCP (n=2; 16,7%) e *Streptococcus* spp. (n=1; 8,33%).

Segundo Aires de Souza et al. (2007), *S. aureus* é o mais importante agente etiológico da infecção mamária na maioria dos ruminantes domésticos. Islam et al. (2012) e Langoni et al. (2012), num estudo com 50 e 378 cabras em lactação, respectivamente, também constataram que *S. aureus* foi o microrganismo mais presente nos animais com mastite subclínica. Além disso, vários autores relataram maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa - SCN em amostras de leite de cabras com mastite subclínica, os quais causam uma infecção inaparente e persistente (LEITNER et al., 2004; KOOP et al., 2012; SOUZA et al., 2012; PATERNA et al., 2014).

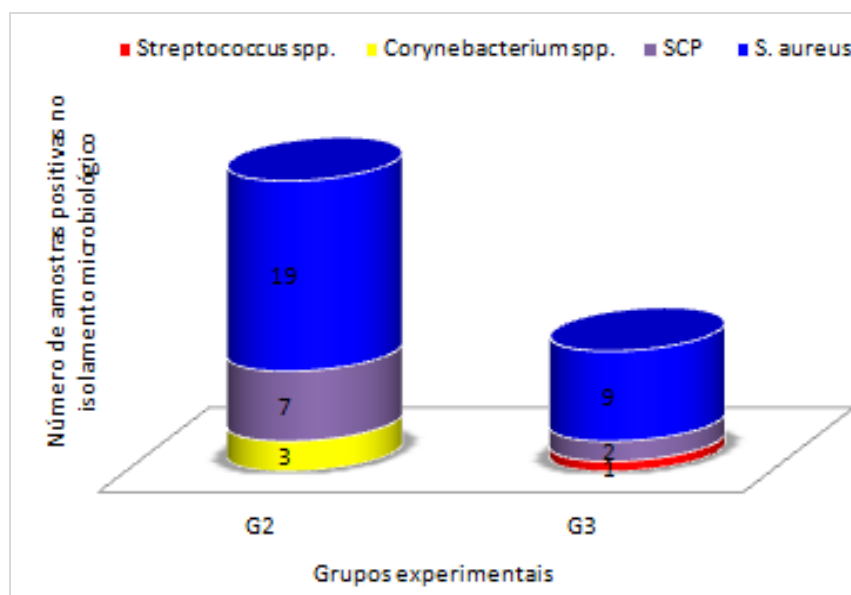


Figura 8. Resultado do isolamento microbiológico no leite de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

5.2.5 Perfil bioquímico do soro lácteo

A avaliação do perfil bioquímico do soro lácteo dos três grupos experimentais mostrou que as amostras das cabras com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3) apresentaram maiores atividades das enzimas fosfatase alcalina (G2: 122 U/L e G3: 207 U/L) e gamaglutamiltransferase (G2: 483 U/L e G3: 571 U/L) e maiores concentrações de albumina (G2: 0,18 g/dL e G3: 0,29 g/dL), proteína total (G2: 1,50 g/dL e G3: 1,67 g/dL), cloretos (G2: 190 mEq/L e G3: 202 mEq/L), ferro (G2: 13,4 µg/dL e G3: 19,6 µg/dL) e sódio (G2: 152 mMol/L e G3: 181 mMol/L) quando comparadas com as amostras de soro lácteo das cabras sadias (G1). Por outro lado, as amostras de soro lácteo das cabras sadias (G1) apresentaram maiores concentrações de cálcio total (37,5 mg/dL), fósforo (30,8 mg/dL), magnésio (8,07 mg/dL), potássio (43 mMol/L) e cálcio ionizado (3,60 mMol/L) (Tabela 3 e Figuras 9 e 10).

Os resultados obtidos também corroboram os relatos de Silva et al. (2013), os quais também observaram num estudo com búfalas sadias e com mastite subclínica, maiores concentrações de sódio (165 mMol/L) e cloretos (166 mMol/L) e menores concentrações de cálcio total (33,8 mg/dL), cálcio ionizado (2,46 mMol/L), ferro (1,26 µg/dL), fósforo (26,7 mg/dL), magnésio (5,72 mg/dL) e potássio (28,5 mMol/L) no soro lácteo das fêmeas bubalinas com mastite subclínica, devido, provavelmente, a os mecanismo homeostáticos dinâmicos que respondem à transferência de minerais do sangue para a glândula mamária ou a quantidade de minerais que extravasa para a secreção láctea da mama doente é significativamente baixa para ser detectada.

Nos casos de mastite subclínica, embora não ocorram mudanças clínicas visíveis no úbere ou na aparência do leite, cursam alterações na concentração dos principais componentes da secreção láctea, decorrentes de lesões nas células produtoras e alteração da permeabilidade vascular (BRAMLEY et al., 1996). Estas alterações podem resultar no aumento das concentrações de proteínas, sódio e cloretos e diminuição nos teores de gordura, sólidos totais, caseína, lactose, cálcio, fósforo e potássio (HAENLEIN, 2004).

Já nos casos de mastite clínica, caracterizada por alterações visíveis da glândula mamária e presença de grumos, sangue e/ou pus no leite, as alterações na

concentração dos componentes da secreção láctea são mais acentuadas (FONSECA; SANTOS, 2001).

Tabela 3. Médias e desvio padrão das atividades enzimáticas e das concentrações de catabólitos, eletrólitos e minerais no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Parâmetros	Grupos		
	G1	G2	G3
Fosfatase alcalina (U/L)	16,9±6,46 ^A	122±43,0 ^B	207±91,4 ^B
Gamaglutamiltransferase (U/L)	355±21,5 ^A	483±120 ^{AB}	571±99,5 ^B
Albumina (g/dL)	0,13±0,03 ^A	0,18±0,03 ^{AB}	0,29±0,04 ^B
Proteína total (g/dL)	1,23±0,08 ^A	1,50±0,12 ^B	1,67±0,17 ^B
Cálcio total (mg/dL)	37,5±3,83 ^A	25,0±8,03 ^B	24,9±8,76 ^B
Fósforo (mg/dL)	30,8±5,01 ^A	29,0±4,28 ^A	25,6±4,70 ^A
Magnésio (mg/dL)	8,07±0,53 ^A	7,21±1,83 ^A	6,85±1,92 ^A
Cloretos (mEq/L)	176±13,9 ^A	190±15,2 ^A	202±12,2 ^A
Ferro (µg/dL)	4,41±1,79 ^A	13,4±4,70 ^B	19,6±5,21 ^B
Sódio (mMol/L)	142±10,5 ^A	152±19,0 ^A	181±20,6 ^A
Potássio (mMol/L)	43,8±6,07 ^A	35,8±9,95 ^{AB}	22,8±7,57 ^B
Cálcio ionizado (mMol/L)	3,60±0,42 ^A	2,70±0,62 ^B	2,59±0,76 ^B

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

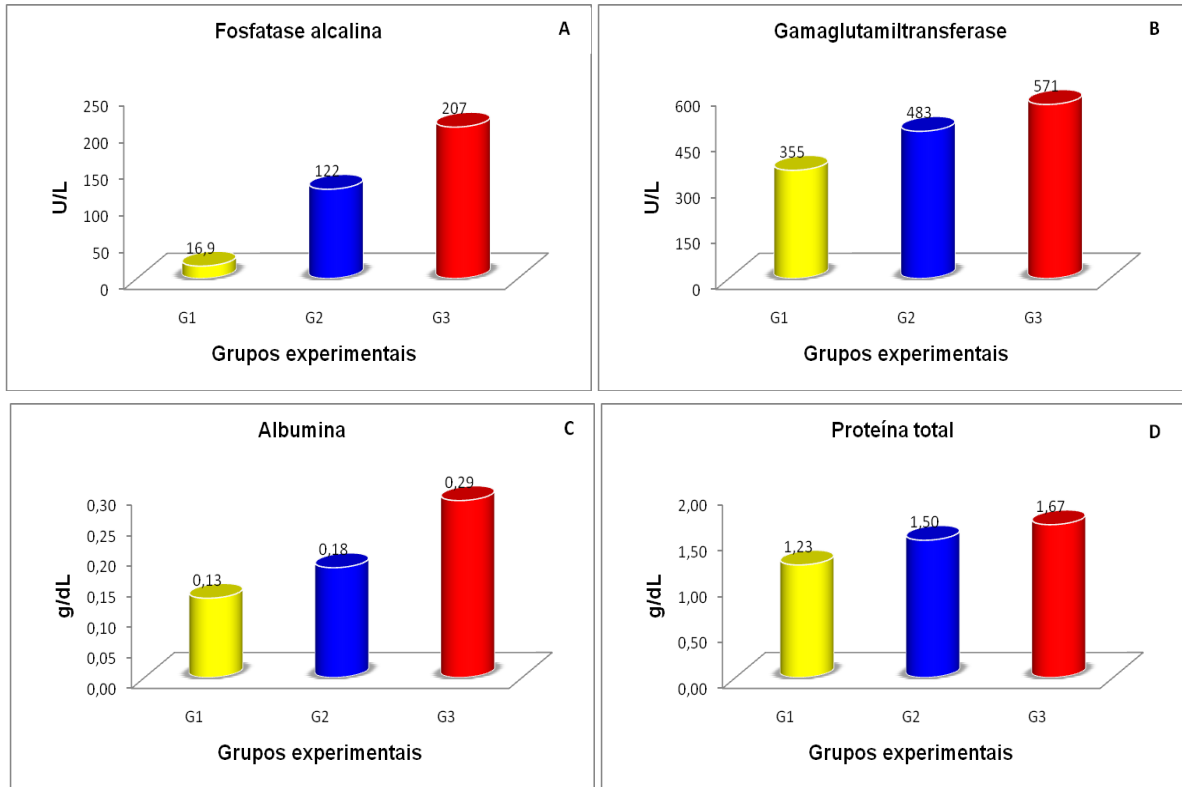


Figura 9. Atividades enzimáticas e concentrações de catabólitos no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: fosfatase alcalina (U/L). B: gamaglutamiltransferase (U/L). C: albumina (g/dL). D: proteína total (g/dL).

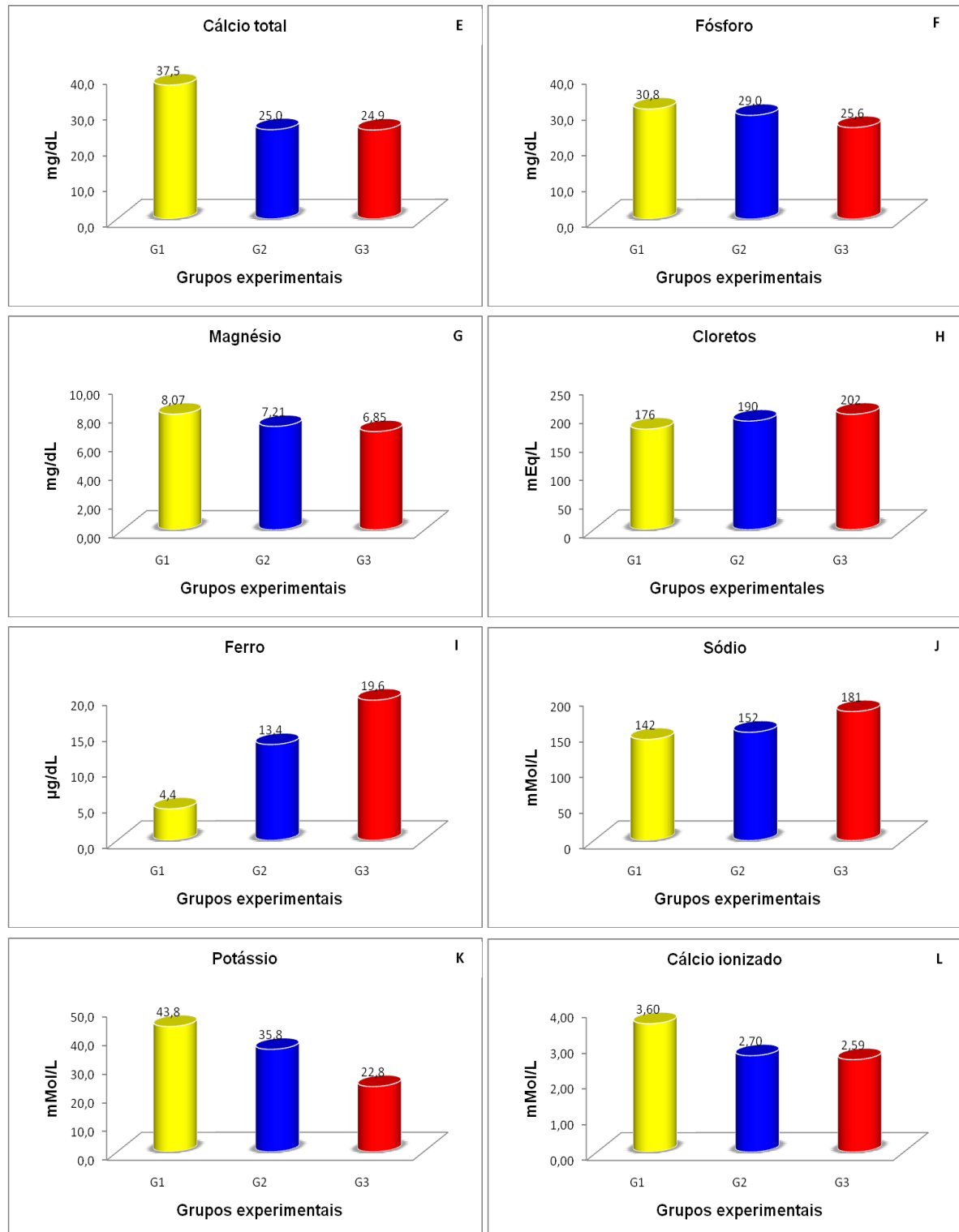


Figura 10. Concentrações de eletrólitos e minerais no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). E: cálcio total (mg/dL). F: fósforo (mg/dL). G: magnésio (mg/dL). H: cloretos (mEq/L). I: ferro (µg/dL). J: sódio (mMol/L). K: potássio (mMol/L). L: cálcio ionizado (mMol/L).

5.2.6 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea

O proteinograma do soro lácteo, obtido pela técnica de SDS-PAGE, possibilitou a detecção de até 22 proteínas (Figura 11), cujos pesos moleculares variaram de 8.700 Da a 162.000 Da. Destas, 10 foram consideradas de interesse e submetidas à análise estatística: imunoglobulina A (IgA), lactoferrina, albumina, imunoglobulina G de cadeia pesada (IgG-CP), β -caseína, imunoglobulina G de cadeia leve (IgG-CL), β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da.

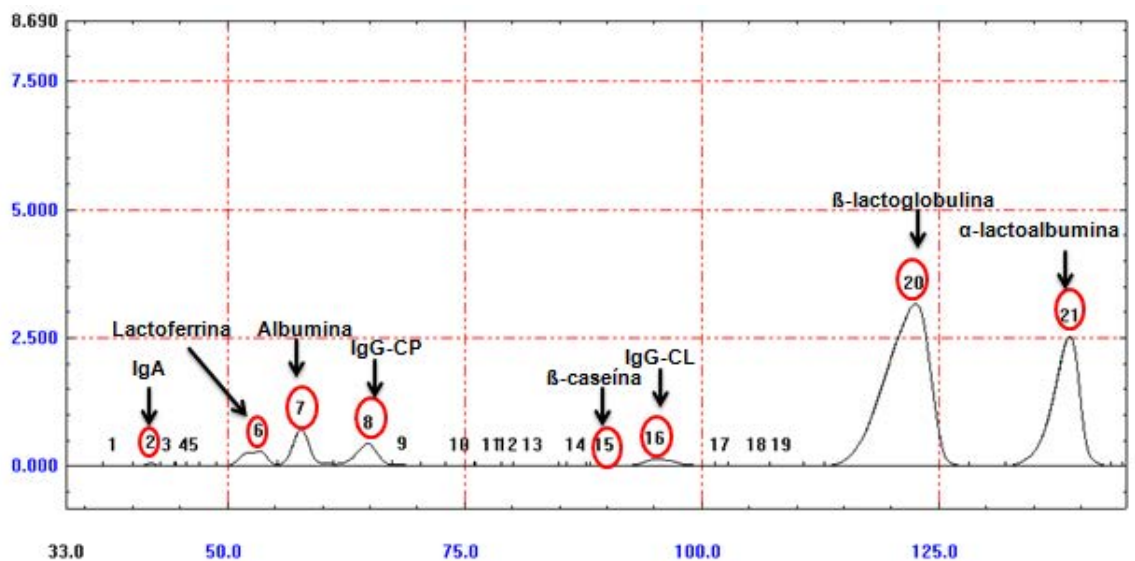


Figura 11. Exemplo de traçado densitométrico das proteínas do soro lácteo de cabras sadias.

A avaliação das frações proteicas do soro lácteo dos três grupos experimentais mostrou que as amostras das cabras com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3) apresentaram maiores concentrações de IgA (G2: 3,26 mg/dL e G3: 3,65 mg/dL), lactoferrina (G2: 111 mg/dL e G3: 127 mg/dL), albumina (G2: 105 e G3: 273 mg/dL), IgG-CP (G2: 94,9 mg/dL e G3: 144 mg/dL), IgG-CL (G2: 73,0 mg/dL e G3: 98,4 mg/dL), β -caseína (G2: 2,13 mg/dL e G3: 3,89 mg/dL) e β -lactoglobulina (G2: 693 mg/dL) quando comparadas com as amostras de soro lácteo das cabras sadias (G1). Por outro lado, as amostras de soro lácteo das cabras

sadias (G1) apresentaram maiores concentrações α -lactoalbumina (315 mg/dL) (Tabela 4 e Figura 12).

As proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da foram encontradas somente nas amostras de soro lácteo das cabras do grupo com mastite clínica (G3) (Tabela 4 e Figura 13).

Num estudo com búfalas sadias e com mastite subclínica, Fagliari et al. (2013) também observaram aumento da concentração de proteína total (1,68 g/dL), lactoferrina (39,1 mg/dL), albumina (84 mg/dL), IgG (26,5 mg/dL), β -lactoglobulina (1.005 mg/dL) e α -lactoalbumina (487 mg/dL) no soro lácteo das fêmeas bubalinas com mastite subclínica.

Santana et al. (2013) verificaram maiores concentrações de proteína total (1,99 g/dL), lactoferrina (288 mg/dL), albumina (289 mg/dL), IgG (435 mg/dL) e haptoglobina (60,2 mg/dL) e menores concentrações de β -lactoglobulina (75,5 mg/dL) e α -lactoalbumina (178 mg/dL) no soro lácteo de vacas com mastite clínica.

Em decorrência dos processos inflamatórios na glândula mamária ocorrem alterações na concentração dos componentes proteicos do leite como também surgimento de compostos proteicos não elaborados no processo de secreção láctea devido a lesões nas células produtoras de leite e alteração da permeabilidade vascular (CECILIANI et al., 2012).

Tabela 4. Médias e desvio padrão das concentrações das frações proteicas no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Parâmetros	Grupos		
	G1	G2	G3
IgA (mg/dL)	2,49±0,28 ^A	3,26±0,57 ^A	3,65±1,17 ^A
Lactoferrina (mg/dL)	47,9±9,27 ^A	111±10,8 ^B	127±14,7 ^B
Albumina (mg/dL)	77,4±8,29 ^A	105±16,2 ^A	273±29,6 ^B
IgG-CP (mg/dL)	57,1±7,00 ^A	94,9±4,89 ^B	144±17,0 ^C
IgG-CL (mg/dL)	44,3±6,39 ^A	73,0±4,41 ^B	98,4±12,5 ^B
β-caseína (mg/dL)	0,99±0,32 ^A	2,13±0,36 ^A	3,89±0,92 ^B
β-lactoglobulina (mg/dL)	669±49,2 ^A	693±59,4 ^A	620±101 ^A
α-lactoalbumina (mg/dL)	315±29,9 ^A	296±31,6 ^{AB}	259±39,9 ^B
39.000 Da	nd	nd	8,09±293
19.000 Da	nd	nd	25,19±7,74

IgA: imunoglobulina A; IgG-CP: imunoglobulina G de cadeia pesada; IgG-CL: imunoglobulina G de cadeia leve

nd: não detectada

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

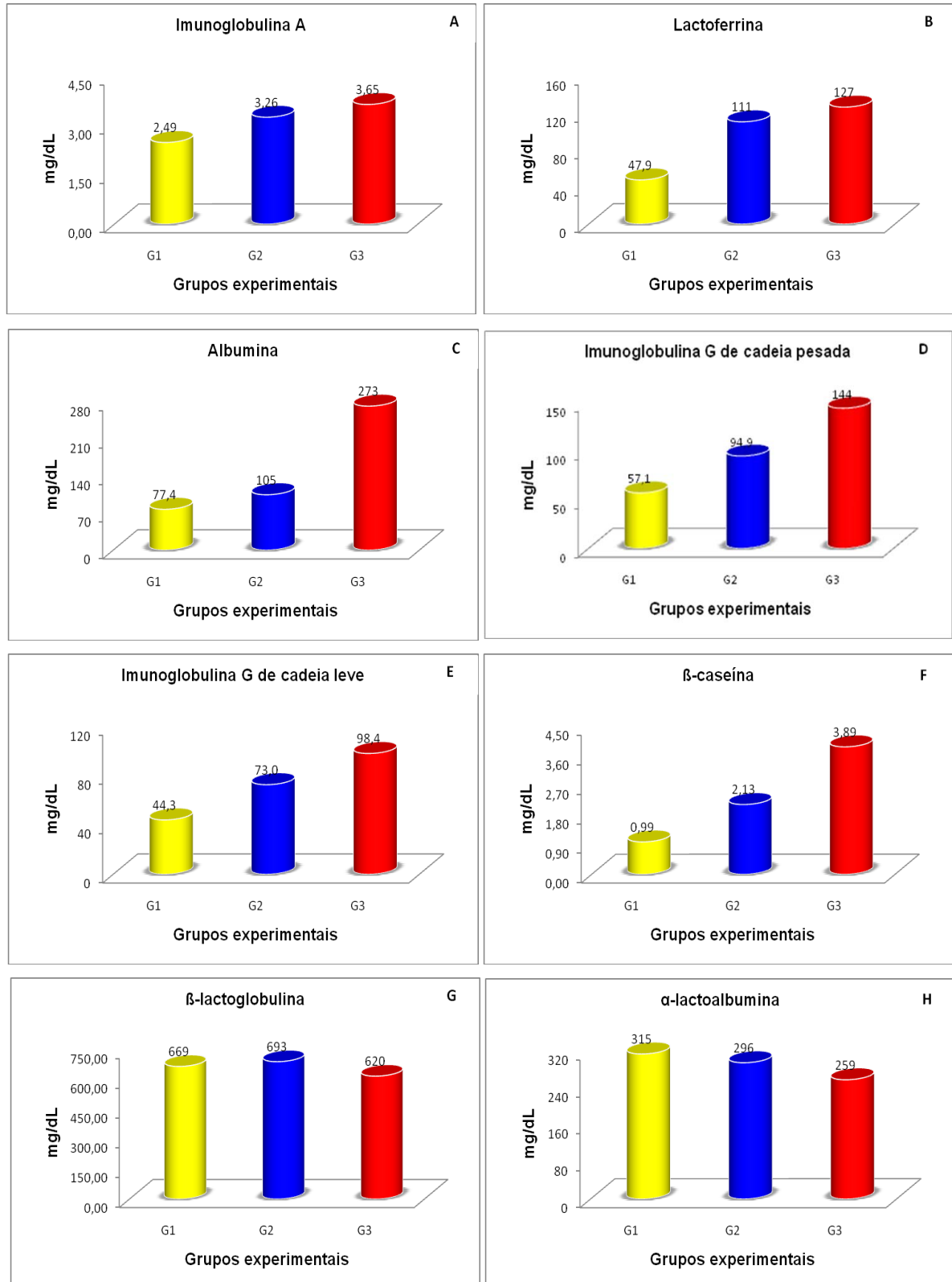


Figura 12. Concentrações das frações proteicas (mg/dL) no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: imunoglobulina A. B: lactoferrina. C: albumina. D: imunoglobulina G de cadeia pesada. E: imunoglobulina G de cadeia leve. F: β -caseína. G: β -lactoglobulina. H: α -lactoalbumina.

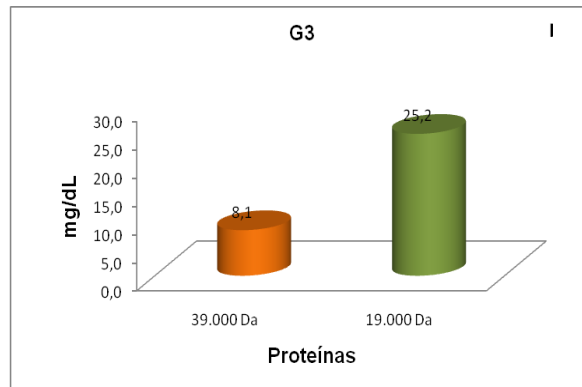


Figura 13. Concentrações das proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da (mg/dL) no soro lácteo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa com mastite clínica (G3).

5.3 Secreção Sanguínea

5.3.1 Perfil bioquímico sérico

A avaliação do perfil bioquímico sérico dos três grupos experimentais mostrou que não houve diferenças significativas entre a maioria dos parâmetros avaliados, com exceção da concentração sérica de ureia e de cloretos, que foram menores nas amostras de soro sanguíneo das cabras com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3) (Tabela 5 e Figuras 14, 15, 16).

Resultados semelhantes foram obtidos por Abba et al. (2013), que verificaram redução dos níveis séricos de sódio e cloretos em cabras com mastite clínica de ocorrência natural e não verificaram diferenças na concentração sérica de proteína total, albumina e potássio de cabras saudáveis e com mastite clínica. De acordo com Wegner e Stull (1978), as pequenas variações nas concentrações de eletrólitos e minerais no soro sanguíneo dos animais com mastite estão relacionadas aos mecanismos homeostáticos, que compensam as perdas destes elementos do sangue para a secreção láctea, e ao fato da quantidade de eletrólitos e minerais extravasada para a glândula mamária ser tão baixa que é irrelevante em relação à concentração sérica destes elementos.

Tabela 5. Médias e desvio padrão das atividades enzimáticas e das concentrações de catabólitos, eletrólitos e minerais do soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Parâmetros	Grupos		
	G1	G2	G3
Aspartato aminotransferase (U/L)	79,6 ± 2,99 ^A	73,7 ± 5,56 ^A	71,5 ± 11,7 ^A
Fosfatase alcalina (U/L)	62,7 ± 12,8 ^A	85,4 ± 9,55 ^A	79,4 ± 27,4 ^A
Gamaglutamiltransferase (U/L)	48,7 ± 3,65 ^A	47,4 ± 2,25 ^A	44,6 ± 3,52 ^A
Creatina quinase (U/L)	145 ± 27,0 ^A	150 ± 5,39 ^A	133 ± 5,89 ^A
Creatinina (mg/dL)	0,98 ± 0,05 ^A	1,04 ± 0,02 ^A	0,97 ± 0,01 ^A
Albumina (g/dL)	2,82 ± 0,17 ^A	2,72 ± 0,06 ^A	2,63 ± 0,13 ^A
Ureia (mg/dL)	56,2 ± 9,34 ^A	53,8 ± 7,93 ^{AB}	44,2 ± 1,59 ^B
Proteína total (g/dL)	8,30 ± 0,15 ^A	8,51 ± 0,25 ^A	8,03 ± 0,54 ^A
Cálcio total (mg/dL)	9,06 ± 0,34 ^A	8,80 ± 0,34 ^A	8,39 ± 0,05 ^A
Fósforo (mg/dL)	6,31 ± 0,78 ^A	6,87 ± 0,63 ^A	7,12 ± 0,25 ^A
Magnésio (mg/dL)	2,50 ± 0,10 ^A	2,47 ± 0,14 ^A	2,46 ± 0,12 ^A
Cloretos (mEq/L)	113 ± 0,53 ^A	110 ± 1,60 ^B	109 ± 4,09 ^B
Ferro (µg/dL)	176 ± 24,9 ^A	185 ± 19,4 ^A	182 ± 8,40 ^A
Sódio (mMol/L)	145 ± 2,28 ^A	145 ± 1,90 ^A	145 ± 1,14 ^A
Potássio (mMol/L)	4,33 ± 0,04 ^A	4,48 ± 0,25 ^A	4,23 ± 0,06 ^A
Cálcio ionizado (mMol/L)	0,75 ± 0,03 ^A	0,89 ± 0,01 ^A	0,89 ± 0,06 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

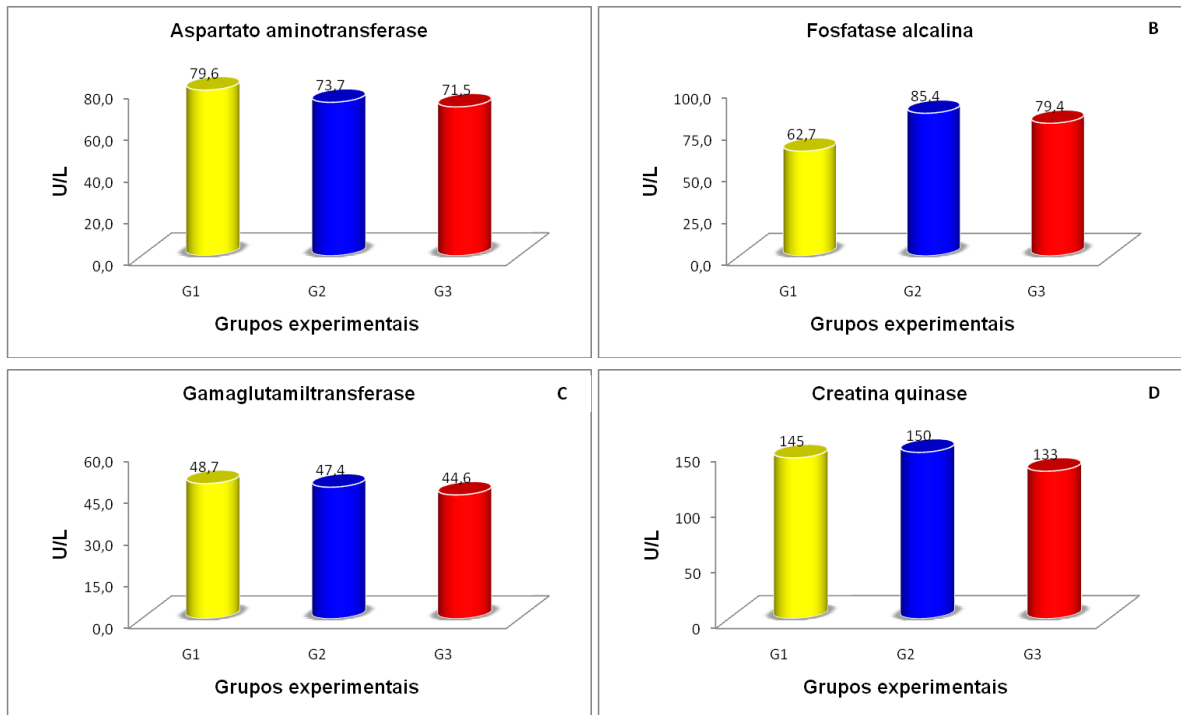


Figura 14. Atividades enzimáticas no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: aspartato aminotransferase (U/L). B: fosfatase alcalina (U/L). C: gamaglutamiltransferase (U/L). D: creatina quinase (U/L).

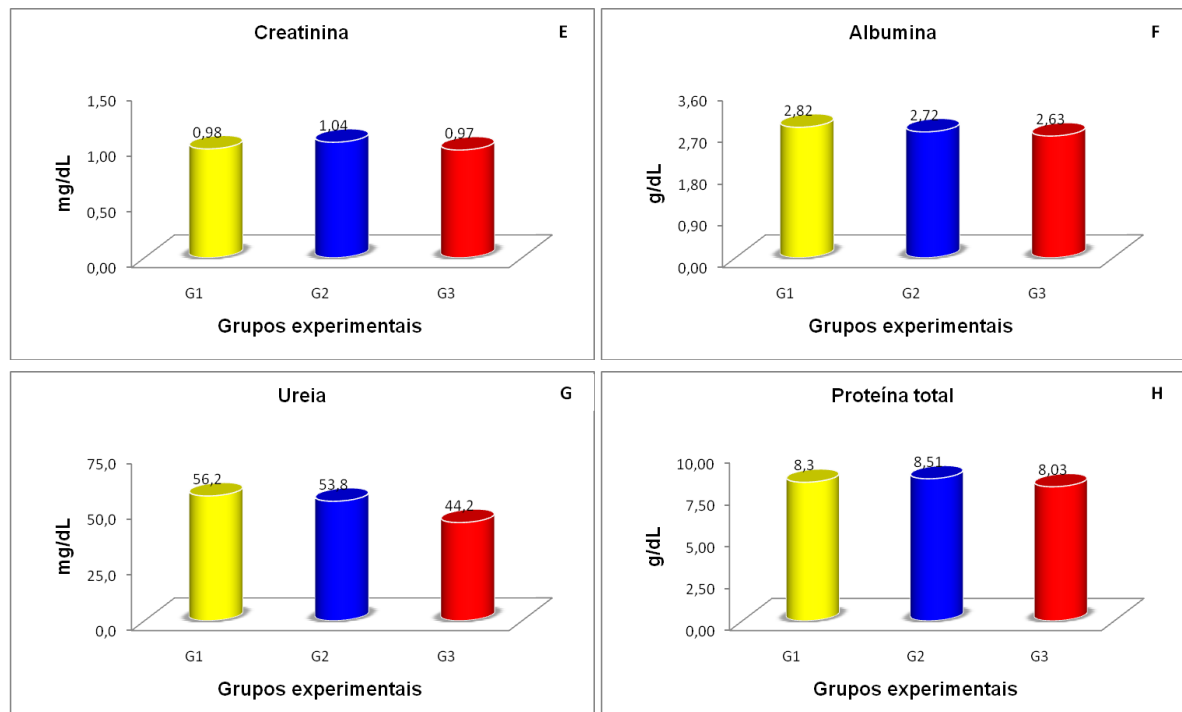


Figura 15. Concentrações de catabólitos no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). E: creatinina (mg/dL). F: albumina (g/dL). G: ureia (mg/dL). H: proteína total (g/dL).

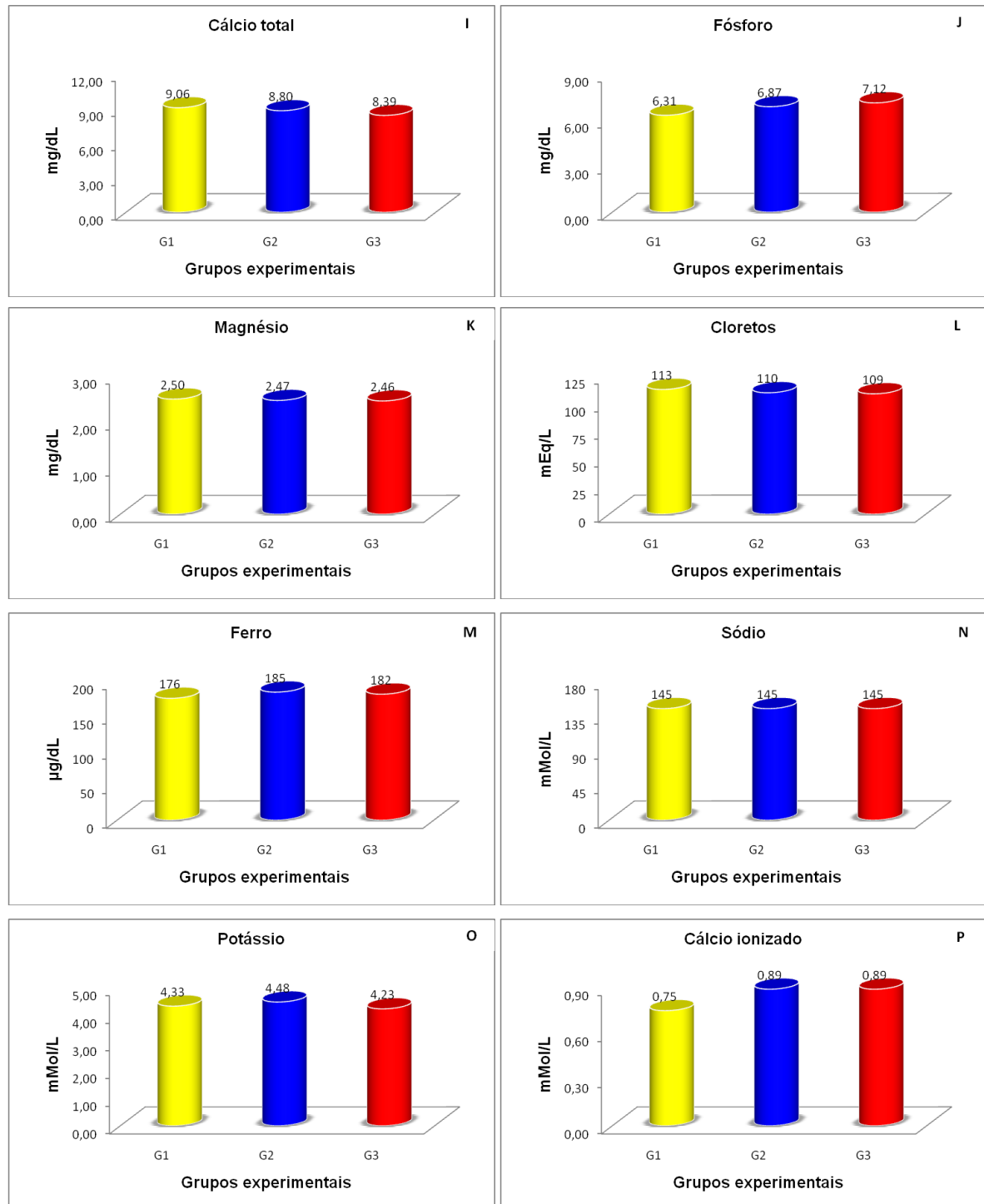


Figura 16. Concentrações séricas de eletrólitos e minerais no soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). K: magnésio (mg/dL). L: cloretos (mEq/L). M: ferro (µg/dL). N: sódio (mMol/L). O: potássio (mMol/L). P: cálcio ionizado (mMol/L).

5.3.2 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas

O proteinograma sérico, obtido pela técnica de SDS-PAGE, possibilitou a detecção de até 23 proteínas (Figura 17), cujos pesos variaram de 22.000 Da a 230.000 Da. Destas, 10 foram consideradas de interesse e submetidas à análise estatística: imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G de cadeia pesada (IgG-CP), haptoglobina, α_1 -glicoproteína ácida, proteína de peso molecular 33.000 Da, imunoglobulina G de cadeia leve (IgG-CL) e proteína de peso molecular 23.000 Da.

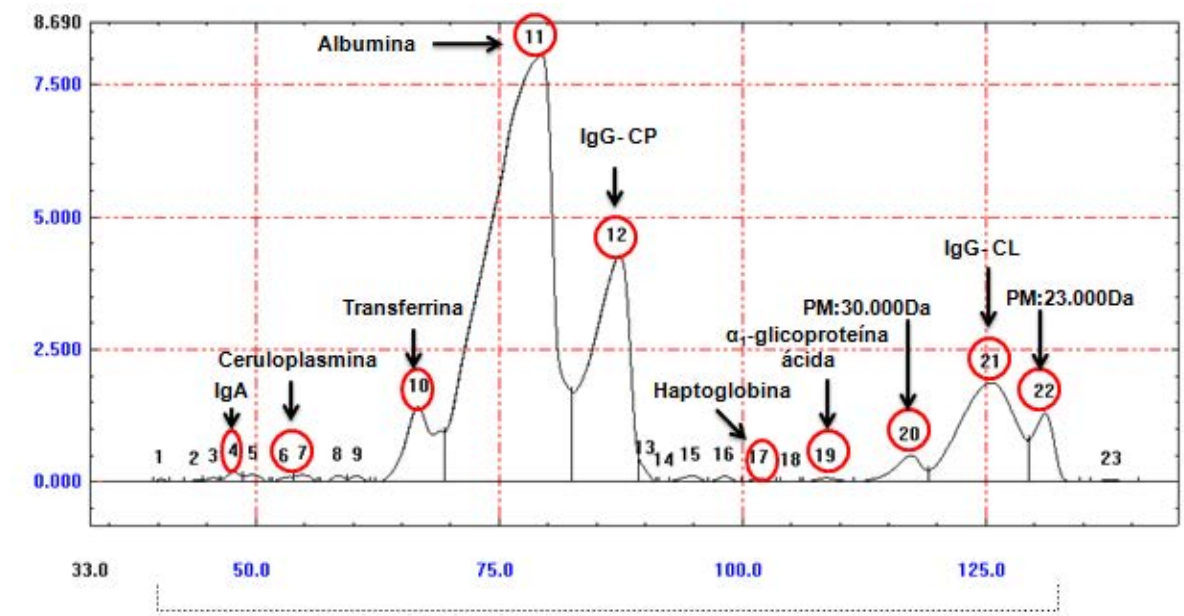


Figura 17. Exemplo de traçado densitométrico das proteínas do soro sanguíneo de cabras sadias.

A avaliação das frações proteicas do soro sanguíneo dos três grupos experimentais mostrou que as amostras das cabras com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3) apresentaram maiores concentrações de IgA (G3: 49,4 mg/dL), ceruloplasmina (G2: 30,1 mg/dL e G3: 46,9 mg/dL), transferrina (G2: 497 mg/dL), IgG-CP (G2: 1.307 mg/dL e G3: 1,152 mg/dL), IgG-CL (G2: 805 mg/dL e G3: 723 mg/dL), haptoglobina (G2: 52,5 mg/dL e G3: 40,2 mg/dL) e α_1 -glicoproteína ácida (G2: 37,7 mg/dL) quando comparadas com as amostras de soro sanguíneo das cabras sadias (G1). Por outro lado, as amostras de soro sanguíneo das cabras

sadias (G1) apresentaram maiores concentrações de albumina (5.289 mg/dL) e proteína de 33.000 Da (126 mg/dL) (Tabela 6 e Figura 18).

De maneira semelhante, Safi et al. (2009) observaram maiores concentrações de haptoglobina em vacas com mastite subclínica. Dado que as principais proteínas de fase aguda (PFA) dos bovinos são a haptoglobina e a amiloide A sérica, ambas PFA positivas, cujas concentrações podem se elevar mais de 100 vezes no soro sanguíneo, principalmente em resposta a uma inflamação aguda (ECKERSALL et al., 1999).

Em ovelhas com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*, Costa et al. (2010) observaram aumento das concentrações séricas de ceruloplasmina e haptoglobina, assim como de IgG e IgA. Em caprinos, Simplício (2011) verificou aumento da concentração sérica de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida em cabras com mastite de ocorrência natural.

Em outro estudo, Simplício (2014) observou que a haptoglobina foi um marcador precoce e confiável na detecção e monitoramento da mastite experimental em cabras induzida por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que o fibrinogênio plasmático e a ceruloplasmina foram marcadores de importância moderada e que a α_1 -glicoproteína se destacou como um marcador de cronicidade nesta espécie animal.

A diminuição da concentração de albumina, considerada PFA negativa, também pode estar relacionada à mobilização de fluidos e proteínas para a glândula mamária, em função da inflamação induzida pela mastite (FONTEQUE et al., 2010; CECILIANI et al., 2012; CRAY, 2012).

Tabela 6. Médias e desvio padrão das concentrações das frações protéicas do soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Parâmetros	Grupos		
	G1	G2	G3
IgA (mg/dL)	37,7 ± 9,84 ^A	37,0 ± 8,72 ^A	49,4 ± 1,94 ^A
Ceruloplasmina (mg/dL)	21,4 ± 8,98 ^A	30,1 ± 2,81 ^{AB}	46,9 ± 12,5 ^B
Transferrina (mg/dL)	480 ± 31,6 ^A	497 ± 38,4 ^A	458 ± 33,7 ^A
Albumina (mg/dL)	5.289 ± 88,4 ^A	5.175 ± 167 ^{AB}	4.874 ± 303 ^B
IgG-CP (mg/dL)	1.059 ± 143 ^A	1.307 ± 142 ^A	1.152 ± 185 ^A
IgG-CL mg/dL	698 ± 136 ^A	805 ± 52,7 ^A	723 ± 97,9 ^A
Haptoglobina (mg/dL)	22,4 ± 5,18 ^A	52,5 ± 4,64 ^B	40,2 ± 10,3 ^C
α ₁ -glicoproteína ácida (mg/dL)	35,2 ± 5,03 ^A	37,7 ± 6,23 ^A	33,2 ± 4,35 ^A
33.000 Da (mg/dL)	126 ± 22,4 ^A	111 ± 10,8 ^A	119 ± 25,1 ^A
23.000 Da (mg/dL)	374 ± 78,1 ^A	387 ± 27,6 ^A	328 ± 43,7 ^A

IgA: imunoglobulina A; IgG-CP: imunoglobulina G de cadeia pesada; IgG-CL: imunoglobulina G de cadeia leve
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

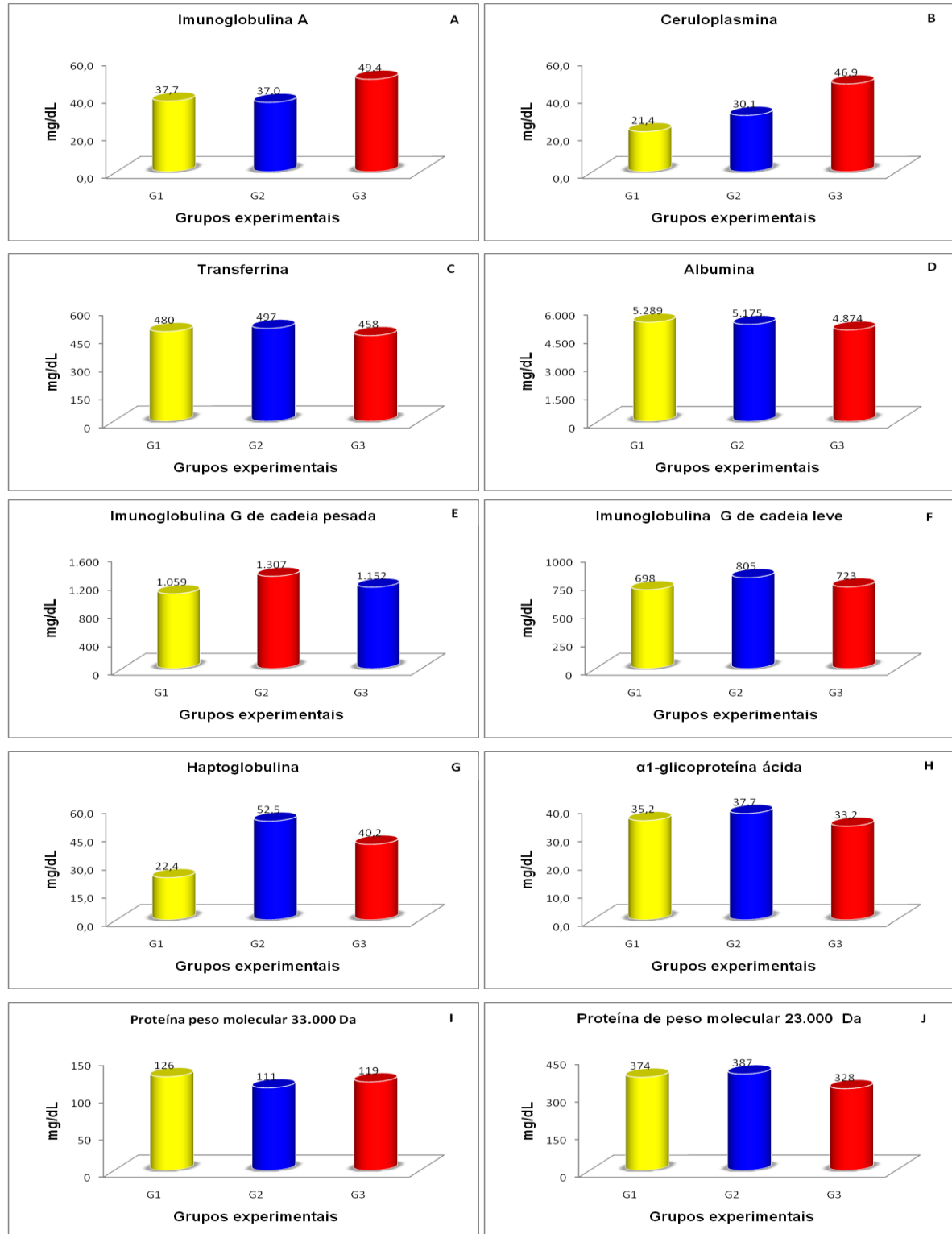


Figura 18. Concentrações das frações proteicas do soro sanguíneo de cabras das raças Saanen e Alpina Francesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3). A: imunoglobulina A. B: ceruloplasmina. C: transferrina. D: albumina. E: imunoglobulina G de cadeia pesada. F: imunoglobulina G de cadeia leve. G: haptoglobina. H: α_1 -glicoproteína ácida. I: proteína de peso molecular 33.000 Da. J: proteína de peso molecular 23.000 Da.

6. CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas diagnósticas como o uso da caneca de fundo escuro, CMT e a CCS devem ser usadas em conjunto para a avaliação adequada da secreção láctea caprina e sempre que possível junto com o exame microbiológico. O *Staphylococcus aureus* é o microorganismo mais isolado neste estudo sendo o 63,3% na secreção láctea das cabras do G2 e 75% do G3, predominando assim os agentes infecciosos contagiosos nas cabras avaliadas. O perfil bioquímico em especial de proteínas de fase aguda (PFA) do soro lácteo se mostrou melhor indicador clínico nos quadros de mastites clínica e subclínica que o perfil químico sanguíneo. Finalizando, ressalta-se que as proteínas de peso molecular 39.000 Da e 19.000 Da, foram identificadas somente no soro lácteo de cabras do G3, podendo ser considerado como um marcador de mastite clínica.

7. REFERÊNCIAS

- ABBA, Y.; IGBOKWE, I. O.; ADAMU, L.; BUBA, I. Alterations in hematological and serum biochemical parameters of Sahel goats with clinical mastitis. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, Dasna, v. 4, n. 4, p. 74-77, 2013.
- AIRES DE SOUSA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; MOTTA, O. V.; BONNA, I. C. F.; SILVA, D. A.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples from Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 12, p. 3845-3849, 2007.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. P. A. **A importância do leite de cabra na nutrição humana**. EMBRAPA Caprinos. Sobral, 2004. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa.htm. Acesso em: 5 jun. 2012.
- ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA A. M. G.; SOUZA, K. C.; SANTOS, D. O. **Controle da Artrite Encefalite Caprina através do uso de tecnologias reprodutivas aplicadas às fêmeas**. Comunicado Técnico Embrapa, nov. 2007. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/admin/pdf/01525320012154.cot86.pdf> Acesso em: 16 out. 2012.
- BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis in dairy small ruminants. **Veterinary Research**, London, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.
- BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, I. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th ed. Madison: National Mastitis Council. 1996. 64p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000**. Diário Oficial da União, Brasília, p. 23, 8 nov. 2000. Seção 1.
- BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da União, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.
- CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.
- CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P. R. Tecnologia dos produtos de origem animal e qualidade do leite. In: ASSIS VIEIRA, E. (Org.). **Leite de qualidade: manejos**

reprodutivos, nutricionais e sanitários. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. cap. 8, p.115-175.

CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C.; SIERRA, D.; MARCO, J. Prevalence and etiology of nonclinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.17, n. 1, p.71-78, 1995.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ LÓPEZ, A.; CORRALES, J. C. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. In: JORNADA CIENTIFICA DE LA SEOC, 26., 2001, Sevilla. **Anais...** Sevilla: Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 2001. p. 71-83.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 145-153, 2007.

CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; SANCHEZ, A.; LUENGO, C. Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. **Tratado de patología y producción ovina: Mamitis caprina I**, n. 53, p. 33-55, 1997.

COSTA, N. A.; SIMÃO, L. C. V.; SANTOS, R. A.; AFONSO, J. A. B.; FAGLIARI, J. J.; CARDOSO, E. C.; SOARES, P. C.; MENDONÇA, C. L. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 5, p. 435-442, 2010.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.178, n. 7, p. 713-719, 1981.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, San Diego, v. 105, p. 113-150, 2012.

DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 2-3, p. 161-166, 1995.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WERGIN, W. P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v, 45, n. 5, p. 435-439, 1982.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 151, n. 7, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **The Veterinary Journal**, London, v.168, n. 1, p.3-5, 2004.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, London, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

ECKERSALL, P. D.; DUTHIE, S.; SAFI, S.; MOFFATT, D.; HORADAGODA, N. U.; DOYLE, S.; PARTON, R.; D. BENNETT, D. FITZPATRICK, J. L. An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of the interference from albumin. **Comparative Haematology International**, Guildford, v. 9, p. 117–121, 1999.

FAGLIARI, J. J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J. M. Mastite bovina: comparação entre os resultados obtidos no "California Mastitis Test" e o exame bacteriológico. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 4-5, 1990.

FAGLIARI, J. J.; PIZAURO, L. J. L.; SANTANA, A. M.; SILVA, D. G.; LIMA, G. Whey protein concentration in Murrah buffalo healthy or with subclinical mastitis. In: NMC Annual Meeting, 52., 2013, San Diego. **Proceedings...** San Diego: NMC, 2013. 1 CD-ROM.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**, 2. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2001. 175 p.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT: Production: Live Animals**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 09 mar. 2015.

FONTEQUE, J. H.; KOHAYAGAWA, A.; MATTOSO, C. R. S.; LOPES, S. T. A.; PAES, P. R. O.; CASSETARI, M. R.; LANGONI, H. Perfil eletroforético e concentração de imunoglobulina G (IgG) do soro sanguíneo de cabras Saanen com mastite experimental induzida por *Staphylococcus aureus* suplementadas com vitamina E. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 1, p. 79-86, 2010.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SOLER, L.; CÉRON, J. J. Acute phase proteins response in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 20, n. 5, p. 580-584, 2008.

GRÖNLUND, U.; SANDGREN, C. H.; WALLER, K. P. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. **Veterinary Research**, London, v. 36, n. 2, p. 191-198, 2005.

HAENLEIN, G. F. W. Goat Milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p.155-163, 2004.

ISLAM, M. R.; AHAMED, M. S.; ALAM, M. S.; RAHMAN, M. M.; SULTANA, T.; ROH, Y.; KIM, B. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 32, n. 2, p. 179-182, 2012.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk: enumeration of somatic cell**. Brussels: IDF/FIL, 1995. 8 p. (IDF Standard, 148A).

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993. 417 p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. New York: Academic Press, 2008. 916 p.

KARZIS, J.; DONKIN, E. F.; PETZER, I. M. The influence of intramammary antibiotic treatment, presence of bacteria, stage of lactation and parity in dairy goats as measured by the California Milk Cell Test and somatic cell counts. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. Pretoria, v. 74, n. 2, p. 161-167, 2007.

KIFARO, G.; MOSHI, N. G.; MINGA, U. M. Effect of subclinical mastitis on milk yield and composition of dairy goats in Tanzania. **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, Kenya, v. 9, n. 1. p. 623-634, 2009.

KOOP, G.; DE VliegHER, S.; DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; NIELSEN, M.; VAN WERVEN, T. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. **Journal of Dairy Science**. Champaign v. 95, n. 9, p. 5075–5084, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGONI, H.; CITADELLA, J. C. C.; MACHADO, G. P.; FACCIOLI, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 115-122, 2012.

LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; CHIEBAO, D.; GABRIEL, F. H.; PAULIN, L.; CASTRO, V.; NASSAR, A. F. C.; PIATTI, R.; OKUDA, L.; ROMALDINI, A. H. C. N.; FEDERSONI, I. S. P.; LUCCHESI FILHO, A.; FELÍCIO, A. L. A.; PINO, F. A.; AZEVEDO, S. S.; CARDOSO, M. V. Inquérito sorológico de lentiviruses de pequenos ruminantes (Maedi-Visna e artrite-encefalite caprina) no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 18-25, 2013.

LEITNER, G.; CHAFFER, M.; SHAMAY, A.; SHAPIRO, F.; MERIN, U.; EZRA, E.; SARAN, A.; SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 46–52, 2004.

MADUREIRA, K. M.; GOMES, V.; CASTRO, S. R.; KIAMURA, S. S.; ARAUJO, P. W. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 4, p. 311-316, 2010.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 74-83, 2012.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M. D.; CERÓN, J. J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas em medicina veterinária. **Anales de Veterinaria de Murcia**, Murcia, v. 17, p. 97-114, 2001.

MATOS, J. R. **Proteínas de fase aguda em borregos e ovelhas nos períodos de pré-parto e lactação**. 2005. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 245-254, 2001.

MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 113-117, 1997.

MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 3, p. 57-61, 2008.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Artritis-Encefalitis Caprina y Maedi-visna**. Disponível em: <http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.07.03-04.%20Artritis-Encefalitis%20caprina%20y%20Maedi%20Visna.pdf>. Acesso: 06 out. 2012.

O'MAHONY, M. C. O.; HEALY, A. M.; HARTE, D.; WALSHE, K. G.; TORGERSON, P. R.; DOHERTY, M. L. Milk amyloid A: correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. **Research in Veterinary Science**, London, v. 80, n. 2, p. 155–161, 2006.

PATERNA, A.; CONTRERAS, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; AMORES, J.; TATAY-DUALDE, J.; PRATS-VAN DER HAM, M.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; DE LA FE, C. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 36-41, 2014.

PERSSON, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. **Acta Veterinaria**

Scandinavica, London, v. 53, n. 15, p. 1-5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-53-15>>.

PETZER, I. M.; DONKIN, E. F.; DU PREEZ, E.; KARZIS, J.; VAN DER SCHANS, T. J.; WATERMEYER, J. C.; VAN REENEN, R. Value of tests for evaluating udder health in dairy goats: somatic cell counts, California Milk Cell Test and electrical conductivity. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. Pretoria, v. 75, n. 4, p. 279-287, 2008.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis**. Naperville: Babson Bros., 1991. 150 p.

PRESCOTT, S. C.; BREEED, R. S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **The Journal of Infection Disease**, Cary, v.7, n. 5, p.632-640, 1910

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

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Editora Roca, 2005. 513 p.
QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 55 p.

SAFI, S.; KHOSHVAGHTI, A.; JAFARZADEH, S. R.; BOLOURCHI, M.; NOWROUZIAN, I. Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 38, n. 4, p. 471-476, 2009.

SAINI, P.K.; WEBERT, D. W. Application of acute phase reactants during antemortem and post-mortem meat inspection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 198, n. 1, p. 1898–1901, 1991.

SANT'ANA, V. A.C.; BIRGEL, E. H. Obtenção do soro lácteo para o fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poli(acrilamida). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUITARIA, 5. 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buitaria, 2003. p. 31.

SANTANA, C. H.; SANTANA, A. M.; SILVA, D. G.; PIZAURO, L. J. L.; FAGLIARI, J. J. Alterações no proteinograma do soro lácteo de fêmeas bovinas com mastite clínica causada por bactérias do gênero *Streptococcus*. In: Congresso Brasileiro de

Buiatria, 10., 2013, Belém. **Anais...** Belém: Associação Brasileira de Buiatria, 2013. 1 CD-ROM.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SCHAEREN, W.; MAURER, J. Prevalence of subclinical udder infections and individual somatic cell counts in three dairy goat herds during a full lactation. **Schweizer-Archiv für Thierheilkunde**, Bern, v. 148, n. 12, p.641-648, 2006.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SHEARER, J. K.; HARRIS Jr., B. **Mastitis of dairy goats**. 2003. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/DS120>>. Acesso em: 11 jun. 2008.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 89, n.2-3, p. 110-124, 2010.

SINGH, S. V.; PACHAURI, S. P. Acute phase proteins in bovine mastitis. **Indian Journal of Animal Science**, New Dehli, v. 72, n. 1, p. 20-22, 2002.

SIMPLÍCIO, A. A.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 12, n. 39, p. 7- 18, 2006.

SIMPLÍCIO, K. M. M. G. **Leucograma e proteínas de fase aguda de ruminantes domésticos sadios e enfermos**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

SIMPLÍCIO, K. M. M. G. **Leucograma e perfil bioquímico sérico de cabras com mastite experimental causada por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae***. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

SILVA, D. G.; SANTANA, A. M.; PIZAURO, L. J. L.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; BENINCASA, N. C.; MORAIS, S. M. A.; SANTANA, C. H.; FAGLIARI, J. J. Contagem de células somáticas, concentração de eletrólitos e minerais no leite de búfalas

sadias e com mastite subclínica. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 10., 2013, Belém. **Anais...** Belém: Associação Brasileira de Buiatria, 2013. 1 CD-ROM.

SOUZA, F. N.; BLAZITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M.P.; HEINE MANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Somatic cell count in small ruminants: Friend on toe, **Small, Ruminant Research**, Amsterdam. V. 107, n. 2-3, p. 65-75, 2012.

SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D; RUBIALE, L. **Contagem de Células Somáticas (CCS) em leite de cabra**. Panorama do Leite – Embrapa Gado de Leite, ano 2, n. 10, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade10.html>>. Acesso em: 07 ago. 2008.

SREEJA, S.; BINEESH, P. P.; VIJAYAKUMAR, K.; SASEENDRANATH, M. R. Evaluation of California mastitis test (CMT) as a screening method for subclinical mastitis in Malabari goats. **Indian Journal of Animal Research**. New Dehli, v. 47, n. 6, p. 558-560, 2013.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 269-276.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 175-182.

WEGNER, T. N.; STULL, J. W. Relation between mastitis test score, mineral composition of milk and B-electrolyte profiles in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 12, p. 1755-1759, 1978.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663 p.

ZENG, S.S. Comparasion of goat milk standards with cow milk standards for analysis of somatic cell count, fat and protein in goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 221-225, 1996.

ZENG, S.S, Escobar, E.N, Hart, S.P; Hinckey, L.; Brulthius, M.; Robinson, G, R.; Jahnke, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, countins method, storage and 51, perrent of somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 103-107, 1999.