

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA

DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

Avaliação colostrar de búfalas (*Bubalus bubalis*) com e sem mastite e de níveis imunes séricos de bezerros bubalinos.

Araçatuba
2019

DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

Avaliação colostrar de búfalas (*Bubalus bubalis*) com e sem mastite e de níveis imunes séricos de bezerros bubalinos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Associado Francisco Leydson Formiga Feitosa

Araçatuba
2019

C172a Camargo, Diogo Gaubeur de
 Avaliação colostrar de búfalas (*Bubalus bubalis*)
 com e sem mastite e de níveis imunes séricos de
 bezerros bubalinos. / Diogo Gaubeur de Camargo. -
 Araçatuba, 2019
 73 f. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária,
 Araçatuba
 Orientador: Francisco Leydson Formiga Feitosa

 1. Búfalos. 2. Colostro. 3. Imunidade Passiva. 4.
 Citocinas. 5. Mastite. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação colostrar de búfalas (*Bubalus bubalis*) com e sem mastite e de níveis imunes séricos de bezerros bubalinos

AUTOR: DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

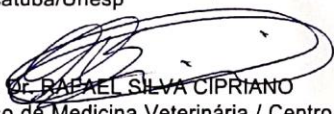
ORIENTADOR: FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Pós-doutoranda LINA MARIA WEHRLE GOMIDE
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium do Campus de Araçatuba - UNISALESIANO


Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI
Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina da Fundação Educacional de Andradina

Araçatuba, 22 de fevereiro de 2019.

Dedico a realização desta conquista a meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, e me incentivaram a buscar o conhecimento e enfrentar os desafios que nos são propostos. Aos meus irmãos que, com sua amizade, me motivaram a vencer os obstáculos da vida pessoal e profissional. A minha esposa pelo companheirismo, amizade e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, pela capacidade, inteligência, saúde e a dedicação aos estudos e ao trabalho.

Aos meus pais, Diná e Laerte, pelo carinho, apoio incondicional e incentivo.

Aos meus irmãos, Laerte Jr. (Gordo) e Lucas (Comandante), pela amizade e companheirismo.

À minha esposa Laura, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

À Dona Eloisa, Sr. João e Marília pela amizade, apoio e por me acolherem em sua família.

À Suely, Carlos e Kalu pelo apoio e carinho de verdadeiros pais.

Ao amigo e orientador Francisco Leydson F. Feitosa, por ter aceitado me orientar, pela confiança, paciência e compreensão e, acima de tudo, pela amizade durante todos esses anos.

À professora Dra. Juliana Peiró, pela ajuda na realização do projeto e, principalmente, pela ajuda, amizade e incentivo nos momentos de dificuldade. Muito obrigado.

À professora Dra. Márcia Marinho e Cilene pela ajuda incondicional com as análises microbiológicas.

Ao meu amigo e irmão de coração Leonardo, pela amizade sincera, apoio incondicional em todos os momentos e pela ajuda no processamento das amostras.

Ao meu grande amigo Eduardo Panelli (Feio) pela amizade, companheirismo e pela ajuda na coleta das amostras na propriedade.

Ao meu grande amigo Rodrigo (Japa) que sempre foi uma referência pessoal e profissional, ao meu tio Nazaré pelos momentos de alegria e pelas histórias bem exageradas, mas inesquecíveis, ao senhor José Colturato (Seu Zé) pelo carinho de um verdadeiro avô, ao meu grande amigo China pela amizade e o carinho de um verdadeiro pai e à minha avó Lúcia, exemplo de amor e carinho. Infelizmente não puderam compartilhar comigo esse momento, mas carrego todos em meu coração, vocês foram muito importantes para mim, muito obrigado.

À toda equipe de neonatologia Fernanda, Larissa, Natália e Guilherme pela amizade, ajuda e conselhos que me ajudaram muito na realização desse trabalho.

Ao Sítio Paineiras do Ingaí, por permitir que toda essa pesquisa fosse possível em especial ao senhor Otávio Bernardes, Marina Migliano e, também, a todos os funcionários.

A todos residentes do hospital veterinário de grandes animais.

Aos professores Luiz Cláudio Nogueira Mendes, Lina Maria Wehrle Gomide, Flávia de Almeida Lucas e Paulo Sérgio Patto, pelo auxílio na realização desse trabalho e por terem sido grandes incentivadores do meu crescimento profissional.

A todos os professores da pós-graduação, com quem tive a oportunidade de conviver, pelos preciosos ensinamentos.

A todos os colegas e amigos da pós-graduação que compartilharam esta etapa.

Às funcionárias da biblioteca pelo auxílio na consulta bibliográfica.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e aos funcionários do setor de Pós-graduação desta unidade pelo apoio e suporte.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, Campus de Araçatuba, por permitir que realizasse mais esta etapa acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa (processo 2012/21394-4) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

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

Cante comigo, cante pelos anos, cante pelo riso e cante pelas lágrimas. Cante comigo mesmo que seja só por hoje, talvez amanhã o bom Senhor te levará.
Sonhe, sonhe, sonhe. Sonhe para você um sonho que se realiza. Sonhe, sonhe, sonhe e sonhe até seu sonho se realizar.

(Dream on - Steven Tayler)

CAMARGO, D. G. **Avaliação colostrar de búfalas (*Bubalus bubalis*) com e sem mastite e de níveis imunes séricos de bezerros bubalinos.** 2019. 73 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da mastite, clínica e subclínica, em búfalas mestiças da raça Murrah nas características físicas, microbiológicas e imunes do colostro produzido com relação à eficiência de transferência de imunidade passiva em seus respectivos bezerros. Para isso acompanhou-se o parto de 30 búfalas e de seus bezerros que foram divididos em dois grupos de acordo com o resultado do cultivo bacteriano observado na secreção colostrar. Avaliou-se a presença de alterações físicas na glândula mamária e macroscópicas das secreções lácteas, foi realizado a contagem de células somáticas, o California Mastitis Test (CMT) e foram mensuradas as concentrações de IL-6 e TNF- α e traçado eletroforético das secreções lácteas e séricas dos bezerros, no momento do parto, às 24 e 48 horas após. A CCS e o CMT mostram-se como importantes indicadores da ocorrência de mastite subclínica, porém baixos valores de CCS e/ou resultados negativos do CMT não implicam, necessariamente, na ausência de infecção intramamária. A presença de agentes microbianos provocou alterações físicas discretas no parênquima mamário e nas características macroscópicas das secreções lácteas das búfalas. Os agentes microbianos isolados nas amostras de colostro foram *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp e *Bacillus cereus*, sendo o *Streptococcus* spp. o mais comumente isolado. A ingestão de colostro de vacas bubalinas com mastite subclínica não influencia a transferência de imunidade passiva para os bezerros. As concentrações de IL-6, TNF- α , PT, IgG e IgA não diferem em búfalas com e sem isolamento microbiano em suas secreções lácteas. Bezerros que ingeriram colostros positivos ao cultivo apresentaram maiores teores de IL-6, TNF- α e menores concentrações de PT e IgG.

Palavras-chave: Búfalos. Colostro. Imunidade Passiva. Citocinas. Mastite

CAMARGO, D. G. **Colostrum evaluation of buffaloes (*Bubalus bubalis*) with and without mastitis and serum immune levels of their calves.** 2019. 73 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of clinical and subclinical mastitis on crossbred Murrah buffaloes on the physical, microbiological and immune characteristics of colostrum produced in relation to the passive immunity transfer efficiency in their respective calves. For this, 30 calf buffaloes and their calves were divided into two groups according to the result of the bacterial culture observed in the colostrum secretion. The presence of physical changes in the udder and macroscopic glands of milk secretions was evaluated, the somatic cell count, the California Mastitis Test, and the concentrations of IL-6 and TNF- α and electrophoretic tracing of milk and serum secretions of the calves, at the time of delivery, at 24 and 48 hours after. CCS and CMT are important indicators of the occurrence of subclinical mastitis, but low CCS values and / or negative CMT results do not necessarily imply the absence of intramammary infection. The presence of microbial agents caused discrete physical alterations in the mammary parenchyma and the macroscopic characteristics of buffalo milk secretions. The microbial agents isolated in the colostrum samples were *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. And *Bacillus cereus*, being *Streptococcus* spp. the most commonly isolated. The ingestion of colostrum from buffalo cows with subclinical mastitis does not influence the transfer of passive immunity to calves. The concentrations of IL-6, TNF- α , PT, IgG and IgA didn't differ in buffaloes with and without microbial isolation in their milk secretions. Calves that ingested positive colostrums had higher levels of IL-6, TNF- α and lower concentrations of PT and IgG.

Keywords: Buffaloes. Colostrum. Passive Immunity. Cytokines. Mastitis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fêmeas bubalinas em lactação deitadas em poças de lama procurando por conforto térmico.....40
- Figura 2 – Búfalas buscando por conforto térmico dentro do cocho de água.41

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação dos escores do CMT dos quartos mamários, levemente positivo (+), nitidamente positiva (++) e fortemente positiva (+++), nas amostras de colostro de búfalas sem isolamento microbiano (GI) e com isolamento microbiano (GII), imediatamente após o parto, às 24 e 48 horas após o parto.37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Identificação microbiológica, frequência (%) e número absoluto de quartos mamários de búfalas com isolamento microbiológico em secreções colostrais colhidas imediatamente após o parto (GII).42
- Tabela 2 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiano positivo (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas após o parto.....43
- Tabela 3 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de proteína total (PT) em amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....44
- Tabela 4 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de proteína total (PT) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.45
- Tabela 5 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina G (IgG) das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento. Araçatuba-SP, 2015.....47
- Tabela 6 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina G (IgG) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....47
- Tabela 7 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina A (IgA) das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.49
- Tabela 8 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina A (IgA) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.49

Tabela 9 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de lactoferrina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....	50
Tabela 10 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de albumina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....	51
Tabela 11 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de albumina em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.	52
Tabela 12 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de β -lactoglobulina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....	53
Tabela 13 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) transferrina em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.	54
Tabela 14 - Valores medianos das concentrações de IL-6 (pg/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento. Araçatuba-SP, 2015.....	55
Tabela 15 - Valores medianos das concentrações de TNF- α (pg/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....	56
Tabela 16 - Valores medianos das concentrações de IL-6 (pg/mL) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 após o referido evento.	57
Tabela 17 - Valores medianos das concentrações de TNF- α (pg/mL) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e	

com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto
(0h), às 24 e às 48 após o referido evento.....58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Transferência de imunidade passiva	21
2.2 Secreção colostrar	22
2.3 Citocinas	23
2.4 Mastite em búfalas	25
2.5 Contagem total de células somáticas (CCS)	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Animais	29
4.1.1 Seleção dos animais	29
4.1.2 Manejo básico dos animais	29
4.2 Colheita das amostras de colostro	30
4.2.1 Preparação das amostras de colostro	30
4.3 Colheita das amostras de sangue	31
4.4 Avaliação das glândulas mamárias	30
4.5 Avaliações Laboratoriais	31
4.5.1 Avaliação macroscópica das secreções lácteas	31
4.5.2 Realização da CCS e do California Mastitis Test (CMT)	32
4.5.3 Análise microbiológica das secreções lácteas	32
4.5.4 Determinação da concentração de citocinas no soro sanguíneo de bezerros e nas secreções lácteas	33
4.5.5 Análise da imunoglobulina G, imunoglobulina A e da proteína total e de fase aguda no soro sanguíneo de bezerros e nas secreções lácteas.	34
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Avaliação física do úbere, características macroscópicas, laboratoriais e microscópicas de secreções lácteas oriundas de búfalas saudáveis e com mastite.	36

5.2	Concentração de proteína total em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.....	44
5.3	Concentração de imunoglobulina G em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.	46
5.4	Concentração de imunoglobulina A em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.	48
5.5	Concentração de lactoferrina em secreções lácteas das búfalas e séricos dos bezerros bubalinos.....	50
5.6	Concentração de albumina em secreções lácteas de vacas bubalinas	51
5.7	Concentração de β -lactoglobulina em secreções lácteas de vacas bubalinas. ...	53
5.8	Concentração sérica de transferrina em bezerros bubalinos	54
5.9	Concentração de IL-6 e TNF- α das secreções lácteas de búfalas e séricos dos bezerros bubalinos.....	55
6	Conclusões.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino no mundo é, atualmente, de 168 milhões de cabeças, sendo que, cerca de 96% pode ser encontrado na Ásia, 2% na África, 2% na América do Sul e 0,3% na Europa (BORGUESE; MAZZI, 2005).

Segundo Borguese e Mazzi (2005) o rebanho bubalino no estado de São Paulo cresce aproximadamente 10% ao ano. Em alguns estados brasileiros, a criação de búfalos se tornou uma opção econômica pela aptidão leiteira e, conseqüentemente, para a fabricação de queijos, originalmente produzidos na Itália. Esses produtos apresentam alta aceitação no mercado nacional, assegurando altos preços e elevada demanda.

O Brasil possui o maior rebanho de búfalos da América (FAO, 2014) com aproximadamente 1,3 milhões de cabeças em 2011. Segundo o IBGE (2016), o efetivo brasileiro de bubalinos era de 1,37 milhão de cabeças, se mantendo estável em relação ao ano anterior. A região Norte concentrou 66,2% da criação de búfalos nacional, enquanto o restante do efetivo ficou distribuído entre as Regiões Sudeste (12,7%), Nordeste (9,5%), Sul (7,4%) e Centro-Oeste (4,4%). O Pará foi responsável por 37,9% de todo o rebanho do País, seguido pelo Amapá (21,6%), representando, juntos, cerca de 89,9% dos animais da Região Norte e 59,5% do rebanho nacional.

Segundo FAO (2014), a produção de leite de búfalas no Brasil passou de 66,5 milhões de toneladas em 2000 para cerca 93 milhões de toneladas em 2011, representando um aumento ao redor de 40% no período. Existem, pelo menos, 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país, que transformam, anualmente, 75 milhões de litros de leite em 22 mil toneladas de derivados, gerando faturamento bruto na ordem de U\$ 156 milhões aos laticínios e cerca de U\$ 41 milhões aos criadores (BERNARDES, 2013).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm mostrado grande interesse nas parturições das diferentes espécies e, particularmente, em suas complicações. O parto normal é um fenômeno mecânico, endócrino e nervoso, com aspectos fisiológicos ainda não inteiramente desvendados (MEIJERING, 1984). O feto bovino sobrevive no útero por oito a 10 horas após o segundo estágio do parto, sendo normalmente expulso em quatro horas após o início da parturição. A mortalidade ocasionada por doenças infecciosas e/ou outros problemas é considerada como

sendo pós-natal, quando a mesma ocorre, geralmente, dentro das primeiras 48 horas de idade (VAN DIETEN, 1963).

De acordo com Davidson (2003), a mortalidade neonatal possui diferentes causas, entre elas: ambiente desfavorável, enfermidades infecciosas e parasitárias, defeitos congênitos ou genéticos, desnutrição, condições inadequadas de saúde materna, falhas de assistência ao parto, bem como, distocias. Cerca de 41% das perdas econômicas são decorrentes de baixa fertilidade e morbidade da matriz, causados principalmente por partos laboriosos, causando grande impacto nas produções comerciais (MEE, 2008).

A taxa de mortalidade neonatal nas primeiras 24 horas após o parto é influenciada principalmente pelo grau de dificuldade no parto e o número de partos das fêmeas (NIX *et al.*, 1998). A estimativa da higidez dos recém-nascidos é grande ferramenta de predição da sobrevivência neonatal (DIESCH *et al.*, 2004) uma vez que a maioria das afecções do período periparto é de aparecimento súbito.

Segundo Afzal *et al.* (1983) a mortalidade em bezerros bubalinos variou de 29,1% a 39,8%. Martin e Wiggins (1973) estimaram que mortalidade de 20% dos bezerros pode resultar em redução de lucro em torno de 38%. Além disso, uma mortalidade média de 25% de bezerros dificulta a reposição dos animais.

Em estudos realizados no Paquistão, Khan *et al.* (2007) relatam que as altíssimas taxas de mortalidade em bezerros bubalinos, em cerca de 88%, foram influenciadas significativamente pelo fator etário, sendo maior durante os três primeiros meses de vida. Outros autores relatam altas taxas de mortalidade nos primeiros meses de vida, a saber: Patil *et al.* (1991) observaram que 33% dos bezerros bubalinos morriam durante o primeiro mês de vida e Prahan e Panda (1994) descreveram altas taxas de mortalidade em búfalos da raça Murrah, durante os dois primeiros meses de vida, em torno de 37%.

Neonatos podem vir a óbito devido a vários fatores, dentre eles destacam-se as doenças virais, bacterianas e a má nutrição. A maioria dos óbitos ocorre principalmente devido à falhas de manejo durante os dois primeiros meses de vida dos bezerros, especialmente em relação aos machos, que, em alguns sistemas de produção, são alimentados de forma inadequada, já que o leite das búfalas, por ser de alto valor, é totalmente comercializado (FAGIOLO *et al.*, 2005).

Vários surtos de diarreia foram descritos na África do Sul como causa de mortalidade de bezerros bubalinos durante o período neonatal (VORSTER *et al.*,

1994) sendo que várias cepas de *E.coli* foram isoladas do intestino delgado e grosso desses animais. Em alguns surtos, Rotavirus e Coronavírus, também foram identificados.

Contribui para a redução dessa mortalidade o conhecimento das variáveis, fisiológicas ou não, dos aspectos clínico e laboratorial, para elucidação, reconhecimento e diferenciação dos estados mórbidos que acometem esses animais (BENESI, 1993).

É crescente a necessidade de se identificar as possíveis doenças e suas interações com o manejo, para a melhor prevenção e controle de surtos; para que isso ocorra, devem-se estabelecer parâmetros bioquímicos e imunológicos dentro do contexto nacional, já que a literatura nacional sobre o assunto não é expressiva em número, e que, a exemplo da internacional, concentra a maioria dos esforços de investigação em bovinos leiteiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transferência de imunidade passiva

Em 1982, Pelerrini ressaltou que a imunidade neonatal representava o conjunto de fatores que intervinham na proteção dos animais recém-nascidos. Essa proteção do neonato era adquirida da mãe, na forma de anticorpos, sendo transferida tanto na fase pré-natal como na fase pós-natal ou, em algumas espécies, de ambas as formas. Duas maneiras de transferência de anticorpos maternos foram descritas: a placentar e a intestinal. Ao contrário do cão e do gato, que poderiam receber imunização passiva ainda quando do desenvolvimento intra-uterino, pela passagem direta de elementos constituintes do sangue materno (BRAMBELL, 1958), a transferência de imunoglobulinas através da placenta não foi considerada de ocorrência em bezerros, cordeiros, leitões e potros (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Nos ruminantes, a placenta do tipo sinepteliocorial une o endométrio materno ao trofotoderma fetal (JAINUDEEN; HAFEZ, 2000), separando as circulações maternas e fetais e impedindo a passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto. Como consequência, os animais nascem agamaglobulinêmicos, e a ingestão e absorção de quantidades adequadas de imunoglobulinas do colostro tornam-se essenciais para o estabelecimento da imunidade passiva (TIZARD, 2008; CEBRA e CEBRA, 2005). Contudo, existem relatos que ocorre transferência limitada de imunoglobulinas através da placenta, em bubalinos (SINGH; AHUJA, 1993)

Para proteger os recém-nascidos que não receberam imunoglobulinas via transplacentária, a natureza desenvolveu meios para fornecer aos bezerros proteção temporária contra os desafios externos, até que o sistema imune fosse capaz de assumir, de fato, o seu papel. Essa imunidade, transferida da mãe para o neonato, por intermédio da ingestão de colostro, foi denominada de imunidade passiva (McCLURE, 1993).

LeJAN (1996) afirmou que as secreções mamárias seriam o principal elo entre a mãe e o recém-nascido, e que, imediatamente após o nascimento, as suas funções ultrapassavam o aspecto nutricional, incluindo a proteção local do trato gastrointestinal e uma variedade de componentes imunes, citocinas, substâncias imunomoduladoras, tais como os derivados da caseína, fatores de crescimento e

hormônios, que, quando absorvidos integralmente, exerceriam funções de fundamental importância na preservação da saúde.

2.2 Secreção colostrar

Concentrações elevadas de Ig no colostro da fêmea, ingestão adequada de colostro pelo bezerro e absorção de Igs do intestino para a corrente circulatória são os principais requisitos que devem ocorrer para que haja sucesso na transferência de imunidade passiva. Qualquer problema em um desses processos pode ocasionar a falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) (BESSER; GAY, 1994).

Os anticorpos são proteínas produzidas por estímulo antigênico e são amplamente encontrados no colostro bovino. Essas proteínas são de extrema importância para os recém-nascidos, pois servem de defesa contra patógenos. Dessa forma, os bezerros necessitam de anticorpos por meio da ingestão de colostro materno (GODDEN, 2008). Cerca de 86% do total de proteínas no colostro de búfalas corresponde a IgG, valor semelhante ao encontrado em colostro bovino (85-90%). Contudo, os valores de IgA e IgM são duas vezes maiores aos encontrados em colostro de vacas (DANG *et al.*, 2009)

A absorção dessas imunoglobulinas é realizada pelos enterócitos do trato digestivo, por meio de pinocitose. A difusão do IgG através do endotélio vascular ocorre por receptores específicos IgG1-F localizados na membrana basal das células do epitélio secretório. Esse processo resulta em concentração de IgG1 colostrar de cinco a 10 vezes maior que a concentração sérica dessas imunoglobulinas no sangue materno, havendo, portanto, diminuição da concentração sérica materna de IgG1 (BESSER; GAY, 1994). Devido a essa característica de passagem das Igs, qualquer dano nas células epiteliais das glândulas mamárias e/ou alteração na função celular causada pela mastite, por exemplo, pode reduzir o transporte de IgG1, e assim, diminuir sua concentração no colostro nas glândulas infectadas. Colostro de glândulas clinicamente alteradas tem menor peso específico na concentração de Ig colostrar (FLEENOR; STOTT, 1980) do que colostro de glândulas sadias (SCHULZ *et al.*, 1985). A maior taxa de absorção de macromoléculas ocorre nas porções mais distais do intestino delgado (CORTESE, 2009). A absorção de imunoglobulinas pelos neonatos é mais intensa nas primeiras

quatro horas pós-parto. Após seis horas, somente 50% da capacidade de absorção é observada; após oito horas, a taxa de absorção decresce para 33%; e, às 24 horas de vida, nenhuma taxa de absorção parece ocorrer (GODDEN, 2008; CORTESE, 2009).

White (1993) citou os fatores maternos (período seco curto, abortos e prematuridade, número de parições, raça, habilidade materna baixa, produção e conformação do úbere), ligados ao manejo (ordenha prévia, incontinência láctea do colostro e a ocorrência de superpopulação) e vinculados ao neonato (anoxia, fraqueza e competição por tetas), como os principais responsáveis por transferência de imunidade passiva inadequada.

Não apenas anticorpos estão presentes no colostro, mas outras células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos, linfócitos B, citocinas, fatores de crescimento e hormônios, que se tornam totalmente ativos após a absorção. Enzimas e minerais como cálcio, fósforo e magnésio também estão presentes (FRANCIOSI *et al.*, 2009). O sistema imune dos neonatos apresenta baixa resposta imune do primeiro ao terceiro dia de nascimento (RAJARAMAN *et al.*, 1997). A partir do quinto dia a resposta imune volta ao normal (CORTESE, 2009). A função dessas células imunes ainda está em estudo, mas sabe-se que tem a função de realçar mecanismos de defesa nos neonatos, aumentar a atividade linfocitária, estimular atividade fagocítica e bactericida no trato digestório e propiciar a transferência de imunidade passiva (GODDEN, 2008; CORTESE, 2009)

2.3 Citocinas

As citocinas são proteínas que participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. São produzidas frente a estímulos de microrganismos e outros antígenos. Elas atuam estimulando diversos eventos sinérgicos que contribuem para o funcionamento e desenvolvimento do sistema imune neonatal. As citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade inata são: Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-1 (IL-1), quimiocinas, Interleucina-12 (IL-12), Interferons tipo 1 (INFs), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-15 (IL-15) e Interleucina-18 (IL-18) (TIZARD, 2008).

Há dificuldades na quantificação e no estudo da ação das citocinas na glândula mamária, pois esta é secretada em intervalo de tempo curto, sendo

completamente consumida durante a sua atuação. A sua ação, preferencialmente local, ocorre em virtude de sua meia-vida curta (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Diferentes tipos de citocinas podem estar presentes no colostro e no leite bovino, porém, as mesmas são detectadas em diferentes fases da lactação ou mesmo nas semanas que antecedem o parto, desaparecendo da secreção mamária imediatamente após a ocorrência do referido evento (BENESI, 2009). Segundo diferentes autores as principais citocinas pró-inflamatórias presentes no colostro e no leite bovino são a IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ (GOTO *et al.*, 1997; HISAEDA *et al.*, 2001; YAMANAKA *et al.*, 2001; PAAPE *et al.*, 2002; YAMANAKA *et al.*, 2003a; YAMANAKA *et al.*, 2003b; HAGIWARA *et al.*, 2000; RANGEN *et al.*, 2009).

Madureira (2011) em estudo realizado com bovinos leiteiros da raça Holandesa também observou a presença de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e colostro de primeira ordenha, e verificou maior quantidade de IFN- γ no colostro e TNF- α no soro, sendo essas citocinas presentes no colostro, absorvidas pela mucosa intestinal dos neonatos bovinos.

A IL-1 é produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também é produzida pelas células de Langerhans, células T, células B, células NK, pelo endotélio vascular, pelos fibroblastos e queratinócitos, e age nas células T, B, NK, neutrófilos eosinófilos, células dendríticas fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos e monócitos. A IL-1 é produzida como uma grande proteína que deve ser clivada por uma enzima conversora para formar a molécula ativa (TIZARD, 2008).

A IL-6 é produzida, particularmente, pelos macrófagos e age nas células T e B, nos hepatócitos e nas células estromais da medula óssea. Promove a produção de IL-2 e a diferenciação das células T e também está envolvida na maturação final das células B em plasmócitos. Age como um có-fator com a IL-1 na síntese de IgM e é o principal estimulador da resposta de fase aguda (TIZARD, 2008). É um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, cirurgias e queimadura (LIN *et al.*, 2000). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia a resposta imune antígeno-específica e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda. Tem ainda ação

importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH *et al.*, 1990; VARELLA; FORTE, 2001).

O TNF- α é secretado pelos macrófagos, células T e B e fibroblastos podendo atuar em quase todas as células nucleadas, agindo tanto na forma solúvel ou ligada à membrana. O TNF- α é um mediador de muitas funções imunes e inflamatórias e regula o crescimento de vários tipos celulares, atua ativando macrófagos, aumentando sua própria síntese junto com IL-1 e IL-6 (TIZARD, 2008). O TNF- α é uma citocina usualmente presente na resposta imunológica mediada por células, assim descrita com base em estudos realizados em camundongos (GENOV; SOLÉ, 2007). Estudos realizados em humanos sobre a transferência de citocinas via placentária e os componentes do colostro/leite têm sugerido o papel das citocinas maternas tais como IL-1, IL-6, TNF- α , na proteção imunológica de neonatos e na modulação do desenvolvimento do sistema imune neonatal, durante a colonização de bactérias comensais (BOCCI *et al.*, 1993).

Como descrito anteriormente, os trabalhos referentes à mensuração e identificação de citocinas no colostro e leite são realizados em bovinos de raças leiteiras, não havendo na literatura internacional ou nacional, trabalhos referentes à espécie bubalina.

2.4 Mastite em búfalas

Vacas leiteiras são mais susceptíveis a mastite durante os períodos mais precoces e tardios do período seco (SMITH *et al.*, 1985) devido à diminuição da capacidade de defesa da glândula mamária (OLIVER; SORDILLO, 1988). A taxa de mastite nos primeiros 21 dias do período seco é cerca de seis vezes maior do que a observada no período que antecede a lactação. Muitas infecções que ocorrem durante o período seco cursam em mastite clínica na lactação subsequente. Portanto, a fase inicial do período seco é o momento ideal para se estabelecer o controle da mastite bovina (NEAVE *et al.*, 1950).

Apesar da possibilidade de a concentração de anticorpos nas secreções mamárias ser considerada medida direta da maturidade ou status imune da búfala, Araújo e Gheller (2005) sugeriram que a presença destes anticorpos no leite serve mais ao consumidor natural do leite (o bezerro bubalino) do que propriamente à búfala. Dessa maneira, a defesa da glândula mamária dos animais de produção está

grandemente dependente dos mecanismos inespecíficos, dentre os quais os leucócitos representam a forma mais eficiente de combate à infecção.

A mastite é uma afecção da glândula mamária que pode ter prevalência de até 71% no rebanho bovino leiteiro brasileiro. Contudo, a maior porcentagem de perdas pela mastite é devido à forma subclínica da doença (70-80%), sendo mais difícil de ser diagnosticada (COSTA, 1995).

Cunha *et al.* (2006) relatou a presença de 5,47% de animais com mastite clínica em um rebanho de 128 animais, e através do CMT foram detectados 41,41% desses animais com mastite subclínica totalizando 20,12% de quartos mamários acometidos em diferentes graus.

O diagnóstico da mastite é realizado por meio do exame físico, avaliação das características do leite, contagem direta de células somáticas por fluxometria, ou indiretamente pelo California Mastitis Test (CMT), contagem bacteriana total e cultura de patógenos do leite (GROUNLUND *et al.*, 2005).

2.5 Contagem total de células somáticas (CCS)

Cerón-Muñoz *et al.* (2002) encontraram média de 63.610 células/mL nas 2.693 amostras de leite bubalino que avaliaram, das quais e 37,65% apresentaram CCS inferior a 17.000 células/mL. No trabalho de Oliveira (2003), a média das contagens foi 170.260 células/mL em 548 análises, variando de 0 a 1.254.000 células/mL, com 93,43% das amostras com CCS abaixo de 250.000 células/mL e 2,18% acima de 500.000 células/mL. Nas mesmas condições, Kapronezai (2004) obteve média de 23.000 células/mL no leite de 262 quartos mamários.

Dhakal (2007), em estudo conduzido na Índia, relatou que búfalas sadias apresentaram contagem média de células somáticas inferiores a 200×10^3 células/mL e que búfalas com mastite subclínica apresentaram contagens de células somáticas superiores a 200.000 células/mL e cultura positiva de microorganismos, sendo a maior prevalência de *Staphylococcus aureus*. Bastos e Birgel (2011) relatam que em isolados de quartos mamários sadios de 96 búfalas, cerca de 28,5% deles apresentavam *Corynebacterium* spp, 24,7% *Staphylococcus* spp; 15,8% *Streptococcus* spp e 11,4% *Arcanobacterium pyogenes* (*Trueperella pyogenes*), sendo que os isolamentos bacterianos, na fase inicial de lactação, foram positivos em 9,7% dos animais, enquanto que, na fase final de lactação, foram de 28,4%.

Segundo os mesmos autores, os animais que apresentaram exame microbiológico negativo tinham, em média, CCS igual a 29.000 células/mL, enquanto que os animais com exame microbiológico positivo possuíam média significativamente maior, de 105.000 células/mL.

Procurando identificar os tipos celulares presentes no leite bubalino e estabelecer uma relação entre suas proporções e o estado de higidez da glândula mamária, Dhakal *et al.* (1992) observaram que no leite normal predominavam as células epiteliais (48,42%), seguidas de linfócitos (29,28%), neutrófilos (20,98%) e monócitos (1,62%). Por outro lado, Silva e Silva (1994) e Silva *et al.* (1996) notificaram neutrófilos predominando com média de 56% da contagem total, sendo os linfócitos o segundo tipo mais comum, com 28%. Em ambos os trabalhos relataram que os macrófagos, as células epiteliais e os eosinófilos constituíram médias respectivas de 8%, 5% e 1%, havendo 2% de células necrosadas. Della Libera *et al.* (2004) acharam em amostras de leite normais 61,1% de monócitos/macrófagos, 32,9% de neutrófilos, 5,3% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos e Kapronezai (2004) uma mediana de 600 células polimorfonucleares/mL em comparação a 1.150 células mononucleares/mL em amostras de leite sem isolamento de microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como proposta global investigar os efeitos da mastite clínica e subclínica em búfalas mestiças da raça Murrah com relação à qualidade de colostro produzido e a imunidade humoral de bezerros recém-nascidos, adquirida passivamente.

3.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer os parâmetros de alterações físicas das glândulas mamárias, alterações macroscópicas das secreções lácteas, contagem total de células somáticas (CCS) e California Mastitis Test (CMT) das búfalas sem e com isolamento microbiológico positivo ao longo das 48 horas pós-parto;

2. Determinar e avaliar as concentrações de proteína total, IgG, IgA e proteínas de fase aguda (albumina, lactoferrina e β -lactoglobulina) no sobrenadante da secreção colostrar de búfalas sem e com isolamento microbiológico positivo, ao longo das 48 horas pós-parto;

3. Determinar e avaliar as concentrações de proteína total, IgG, IgA e proteínas de fase aguda (albumina e transferrina) no soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem e com isolamento microbiológico positivo, ao longo das 48 horas pós-parto;

4. Determinar e avaliar as concentrações de IL-6 e TNF- α presentes no sobrenadante de colostro de fêmeas bubalinas parturientes sem e com isolamento microbiológico positivo e também no soro sanguíneo dos bezerros bubalinos, ao longo das 48 horas pós-parto;

5. Comparar os níveis de proteínas (proteína total, IgG, IgA, proteínas de fase aguda e citocinas) obtidas de secreções lácteas de búfalas, sem e com, aos teores séricos de seus rebentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

4.1.1 Seleção dos animais

Foram utilizadas 30 fêmeas bubalinas mestiças da raça Murrah sem e com mastite, em fase puerperal, residentes em propriedade leiteira localizada na região da Cidade de Alambarí, Estado de São Paulo. Concomitantemente, 30 bezerros, filhos das respectivas búfalas, foram avaliados ao longo das 48 horas de vida. Os animais permaneceram com as suas mães após o nascimento, ingerindo colostro voluntariamente. O critério adotado para a separação dos animais em dois grupos distintos levou em consideração o resultado do isolamento microbiológico realizado por meio de amostras de colostro colhidas logo após o nascimento, sendo assim, as búfalas e seus bezerros foram alocados da seguinte forma, a saber:

Grupo I: Constituído por 12 búfalas primíparas e pluríparas saudáveis, sem crescimento no cultivo bacteriológico, e por 12 bezerros, filhos das respectivas mães.

Grupo II: Composto por 18 búfalas primíparas e pluríparas, com mastite, caracterizada por crescimento positivo no cultivo bacteriológico, e por 18 bezerros, filhos das respectivas mães.

O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA), protocolo 2011-02494.

4.1.2 Manejo básico dos animais

Os animais eram criados a pasto e submetidos à ordenha mecânica duas vezes ao dia. Logo após o parto, o bezerro era deixado com sua mãe por cinco dias, sendo que, a partir do segundo dia, a búfala era submetida ao manejo de ordenha, uma vez ao dia, para que toda a secreção láctea fosse retirada e, ao final do quinto dia, o bezerro era separado de sua mãe. Durante a ordenha não eram adotadas as práticas de manejo habituais às observadas na bovinocultura leiteira para prevenção de mastite, tais como pré e pós-dipping, uso da caneca de fundo escuro, CMT e, quando da secagem dos animais visando o período seco, não eram utilizados antimicrobianos por via intramamária.

4.2 Avaliação das glândulas mamárias

As glândulas mamárias de cada búfala foram avaliadas seguindo-se as recomendações de Maunsell *et al.* (1998). Cada glândula foi examinada segundo as seguintes características, a saber: cor, tamanho, temperatura e consistência. A cor foi classificada como normal e avermelhada. O tamanho foi caracterizado como normal, maior que o esperado, ou menor que o esperado. A temperatura foi indicada como normal, quente e fria. A consistência foi caracterizada como normal (relativamente pastosa), firme e dura, segundo Dirksen (1993)

4.3 Colheita das amostras de colostro

As colheitas foram realizadas após os procedimentos rotineiros de preparo dos animais para a ordenha. Para tanto, a glândula mamária e os tetos foram higienizados, retirando-se as sujidades com papel toalha. Foram desprezados os primeiros três jatos de colostro e leite para avaliação macroscópica. Posteriormente, realizou-se novamente a assepsia da extremidade do teto, particularmente do orifício do teto, utilizando-se algodão embebido em álcool 70%, de acordo com os padrões recomendados em boletim da International Dairy Federation (IDF, 1981) para obtenção das amostras para as demais análises.

4.3.1 Preparação das amostras de colostro

Após assepsia, uma amostra representativa de cada quarto (pool), foi colhida em um tubo do tipo Falcon estéril, de 15 mL, inclinado em ângulo de 90° em relação ao teto, para evitar contaminação. O frasco permaneceu aberto por, no máximo, cinco segundos, sendo posteriormente transportado ao laboratório em caixas de isopor com gelo.

Esse volume foi separado em dois tubos estéreis. Padronizou-se a centrifugação de todos os momentos em microtubos, com capacidade de 1,5mL, em centrífuga própria, a 6000 G durante 30 minutos, a 4°C obtendo, assim, uma solução trifásica. A gordura foi retirada com uma bomba de vácuo e o sobrenadante foi armazenado em criotubos e congelado a -80°C (MADUREIRA, 2011).

À segunda alíquota, adicionou-se solução de renina¹ referente a 10% do volume total presente no tubo, permanecendo em banho-maria a 37°C por 20 minutos até a retração do coágulo. Posteriormente, foram centrifugados a 4200 G por 20 minutos a 15°C. Após a centrifugação, a gordura foi removida com auxílio de uma bomba de vácuo e, a porção intermediária da solução trifásica obtida, foi armazenada em microtubos, com capacidade de 1,5mL e armazenados a -20°C, até o momento das análises laboratoriais (ROCHA, 2010).

4.4 Colheita das amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas dos bubalinos neonatos por meio de punção da veia jugular, usando-se sistema a vácuo² em tubo siliconizado, sem anticoagulante, e com o uso de agulha para múltiplas colheitas (25mm X 8mm). Duas alíquotas de sangue foram colhidas, sendo a primeira destinada à determinação das citocinas presentes no soro. A segunda alíquota, usando-se o mesmo tipo de tubo, foi utilizada visando à quantificação das concentrações de Imunoglobulina G, proteína total e proteínas de fase aguda. A obtenção das amostras sanguíneas foi efetuada ao nascimento, às 24 e às 48 horas de vida.

Logo após a formação do coágulo sanguíneo essas amostras foram centrifugadas e o soro sanguíneo acondicionado em microtubos com capacidade de 2,0 mL e imediatamente congelados a -20 °C, na propriedade, e posteriormente acondicionadas em freezer -80 °C até o momento do processamento.

4.5 Avaliações Laboratoriais

4.5.1 Avaliação macroscópica das secreções lácteas

As secreções colhidas de cada um dos quatro tetos foram avaliadas de acordo com as recomendações de Maunsell *et al.* (1998), com relação a cor, viscosidade, opacidade e consistência. Alguns jatos de colostro foram desprezados em canecas de fundo escuro para avaliar a existência de alterações macroscópicas.

A cor foi classificada como amarela, branca, avermelhada e incolor. A viscosidade foi considerada como viscosa (semelhante à consistência do mel), ligeiramente viscosa (semelhante à consistência de leite) ou aquosa (semelhante à

¹ Coelho Estrella®, Chr. Hansen Brasil Ind. E Com. LTDA, Valinhos, São Paulo

² Vacutainer, Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

consistência da água). A opacidade foi descrita como opaca ou transparente. A consistência avaliada como normal, se não houver a presença de grumos (flocos) ou coágulos. A presença de grumos foi registrada se pequenas partículas brancas ou amarelas estiverem presentes (< 2 mm).

4.5.2 Realização da CCS e do California Mastitis Test (CMT)

A análise das células somáticas das amostras de leite foi realizada nas búfalas imediatamente após o parto, utilizando-se um contador de células somáticas portátil³. Uma amostra representativa de cada quarto mamário (pool) foi coletada em um tubo Falcon estéril com 15 mL de capacidade.

O CMT foi realizado após a colheita de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada. Adicionou-se detergente aniônico neutro⁴, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucleico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação classificou-se em: negativa (0), levemente positivo (+), nitidamente positiva (++) e fortemente positiva (+++) (GRUNERT, 1993). Dessa forma, quanto maior a gelificação da amostra de leite, maior o escore atribuído a essa mistura (BIRGEL, 2004). Esse teste teve por finalidade identificar de maneira rápida e prática os animais acometidos por mastite subclínica (SCHALM *et al.*, 1971). O teste foi realizado logo após o parto, às 24 e às 48 horas após o evento, e os resultados anotados em fichas individuais.

4.5.3 Análise microbiológica das secreções lácteas

Para análise microbiológica foram colhidas amostras assépticas das secreções lácteas de cada quarto mamário logo após a parição de todas as fêmeas envolvidas. Essas serão obtidas segundo as recomendações de Birgel Júnior (2008). Cerca de quinze (15) mL de colostro e leite foram colhidos e armazenados em frascos estéreis. Essas amostras foram congeladas a -20°C imediatamente à sua obtenção. Após o descongelamento, foram semeadas em meio de ágar-sangue de ovino desfibrinado e incubadas a 37°C, e as leituras realizadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a incubação. Os exames bacterioscópicos foram realizados em lâminas coradas pelo método de Gram, sendo que o isolamento dos

³ DeLaval cell counter DCC, DeLaval®, Estocolomo, Suécia

⁴ Reagente CMT, FATEC Indústria de nutrição e saúde animal LTDA, Arujá, São Paulo

microorganismos foi procedido de acordo com as técnicas descritas por Lennette (2007). Quando houve o isolamento de mais de três microorganismos diferentes, considerou-se as amostras como contaminadas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999).

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP.

4.5.4 Determinação da concentração de citocinas no soro sanguíneo de bezerros e nas secreções lácteas

As citocinas IL-6 e TNF- α foram dosadas no soro sanguíneo de bezerros neonatos e no sobrenadante do “pool” de colostro e leite retirado dos quatro quartos mamários de cada fêmea bubalina, sempre em duplicata. No sangue, após a retração do coágulo das amostras em tubo siliconizado sem anticoagulante, as mesmas foram centrifugadas, em centrífuga comum, a 1.600 G por 20 minutos. Os sobrenadantes do soro sanguíneo foram alíquotados em pequenos volumes e armazenados imediatamente a -20°C, sendo transferidos, em até duas semanas, para freezer a -80°C, e descongeladas apenas no momento da quantificação das citocinas. Da mesma forma, o sobrenadante do “pool” de colostro obtido após centrifugação específica (14.000 G, em centrífuga refrigerada) foi armazenado de forma similar às amostras séricas, até a determinação dos teores de IL-6 e TNF- α .

As concentrações de TNF- α e IL-6 foram mensuradas nas amostras pelo método Cytometric Bead Array (CBA), que emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para o painel de citocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando volumes pequenos de amostra.

Brevemente, alíquotas de 25 μ L de soro sanguíneo e soro do leite e alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas foram submetidas à diluição seriada (5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 μ L de diluente apenas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 15 μ L da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α e IL-6,

com subsequente incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 600 G por sete minutos a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram incubadas em 20 µL de uma solução de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 600 G por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado.

Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 µL de reagente F e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo⁵. A aquisição dos dados (2500 eventos) foi realizada a 488 nm.

4.5.5 Análise da imunoglobulina G, imunoglobulina A e da proteína total e de fase aguda no soro sanguíneo de bezerros e nas secreções lácteas.

A determinação da imunoglobulina G e proteínas de fase aguda foi realizada no soro sanguíneo de bezerros neonatos e no sobrenadante do “pool” de colostro e leite retirado dos quatro quartos mamários de cada fêmea bubalina. A quantificação da imunoglobulina G e das proteínas de fase aguda no colostro e leite seguirá a técnica SDS-PAGE, proposta por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de coomassie blue 0,25% durante 10 minutos e posteriormente colocado em solução de ácido acético e álcool metílico para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se tornem nítidas. O gel foi conservado em solução de ácido acético a 7%. As frações foram mensuradas por meio de um programa computadorizado⁶. Como referência foi usada solução marcadora⁷ de diferentes pesos moleculares, além de proteínas purificadas tais como a imunoglobulinas G e as proteínas de fase aguda, tais como a ceruloplasmina, a1-antitripsina, transferrina e a haptoglobina. A proteína total dos soros sanguíneo e lácteo foi determinada pelo método do Biureto (STRUFALDI, 1987), utilizando reagentes comerciais⁸. As leituras foram feitas em analisador

⁵ Accuri C6, BD, San Jose, Califórnia, EUA

⁶ Image Quant TL GE healthcare, versão 7, Buckinghamshire-U.K

⁷ Sigma, St Louis, MO, USA

⁸ Labtest, Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

bioquímico com comprimento de onda adequada para o teste⁹. O princípio do método baseia-se na reação de peptídeos e proteínas presentes no soro sanguíneo e lácteo com íons de cobre, presentes no reativo biureto, em meio alcalino, formando-se complexo de coloração violeta.

4.6 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva empregando-se a distribuição de frequência (%), do teste T para comparar dois grupos independentes ou teste de Mann-Whitney, dependendo de as variáveis estudadas terem distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) ou não, após avaliação quanto à normalidade (Teste Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste Bartlett). Utilizaram-se, no total, 60 animais (30 búfalas e 30 bezerros divididos nos dois grupos). As estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

⁹ Celm,SB-190,Barueri, São Paulo, Brasil

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação física do úbere, características macroscópicas, laboratoriais e microscópicas de secreções lácteas oriundas de búfalas saudáveis e com mastite.

Com relação à avaliação física da glândula mamária dos animais pertencentes ao GI, dois animais apresentaram alteração da consistência em quatro quartos mamários logo após o parto, estando os mesmos firmes. Às 24 horas pós-parto, esses mesmos animais possuíam aumento da temperatura dos quartos mamários, porém a consistência do parênquima apresentava-se normal à palpação; contudo, às 48 horas pós-parto o úbere de todas as fêmeas não possuía nenhuma alteração.

Das fêmeas do GI, duas delas apresentavam, no momento do parto, alteração macroscópica do colostro, com presença de grumos. Nos outros momentos avaliados (às 24 e 48 horas pós-parto) os animais não possuíam qualquer alteração macroscópica da secreção láctea, nem mesmo naquelas portadoras de grumos nas secreções colostrais.

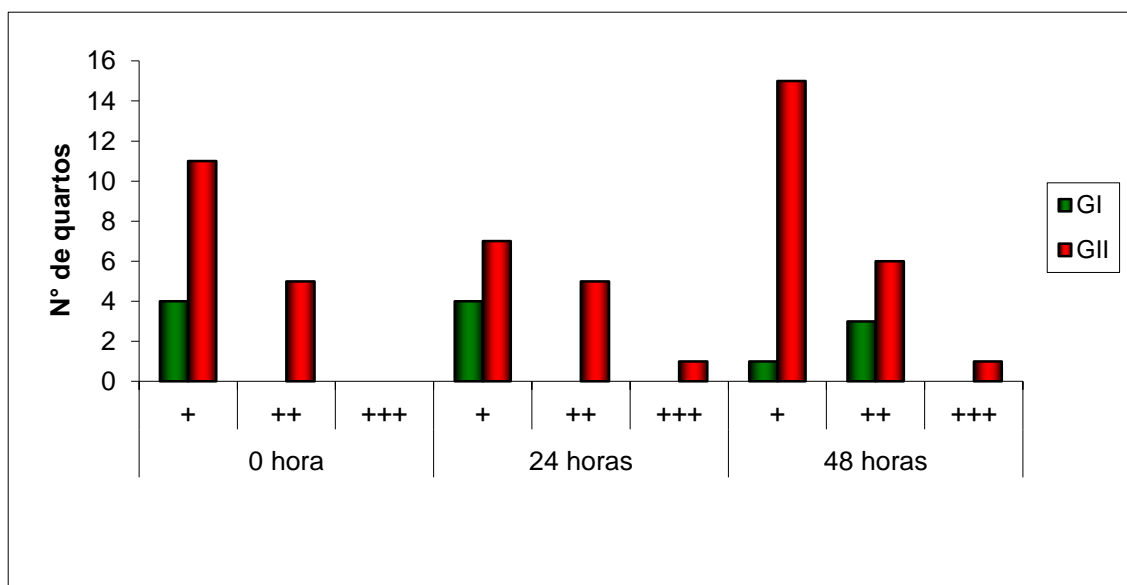
As alterações observadas no parênquima mamário dos animais pertencentes ao GI são decorrentes, provavelmente, do edema pós-parto, sendo que a presença de grumos no colostro deveu-se à reação inflamatória decorrente do processo inflamatório fisiológico, com posterior resolução, após as ordenhas das glândulas mamárias nos dias subsequentes.

No GII, um animal apresentava alteração da consistência (firme) e tamanho (aumentado) de todo o parênquima mamário, logo após o parto; outros dois animais demonstravam alteração de consistência (firme) e um apresentava elevação da temperatura cutânea. As alterações persistiram até a avaliação posterior (24 horas após o parto), tendo sido verificado a presença de um nódulo em parênquima glandular em uma das búfalas. Às 48 horas pós-parto apenas duas fêmeas denotavam alteração de consistência de parênquima (firme), sendo que os outros animais não apresentavam mais quaisquer alterações em glândulas mamárias.

À avaliação macroscópica da secreção láctea das búfalas pertencentes ao grupo II, constatou-se que uma fêmea apresentou colostro avermelhado nos quartos mamários posteriores, esquerdo e direito. Contudo, às 24 horas pós-parto, a

fêmea que denotava alteração de coloração do colostro já tinha secreção láctea com coloração normal e outros dois animais possuíam secreção láctea com presença de grumos, sendo um em quarto mamário anterior direito e o outro em quarto mamário posterior direito, persistindo, tais alterações, até as 48 horas. Como esperado, observou-se maior frequência de colostros positivos, quando avaliados pelo CMT, proveniente de quartos mamários das fêmeas do GII, quando comparados com as amostras de colostro obtidas dos quartos mamários dos animais do GI, em todos os momentos avaliados (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação dos escores do CMT dos quartos mamários, levemente positivo (+), nitidamente positiva (++) e fortemente positiva (+++), nas amostras de colostro de búfalas sem isolamento microbiano (GI) e com isolamento microbiano (GII), imediatamente após o parto, às 24 e 48 horas após



Todos os quartos mamários das fêmeas dos dois grupos foram avaliados por meio do California Mastitis Test (CMT). Dos animais do GI, apenas quatro (8,3%) quartos mamários apresentaram resultado fracamente positivo (+), sendo que todos os outros mostravam-se negativos logo após o parto e às 24 horas; às 48 horas pós-parto, um quarto mamário (2,05%) foi classificado como fracamente positivo (+), e três (6,25%) nitidamente positivos (++) (Gráfico 1).

Já os animais do GII possuíam maior número de colostros positivos, sendo que, logo após o parto, 11 (22,9%) quartos mamários apresentaram resultado fracamente positivos (+), e cinco (10,4%) animais, nitidamente positivos (++); às 24 horas sete (14,6%) quartos mamários foram fracamente positivos (+), cinco (10,4%) nitidamente positivos (++), e um (2,1%) quarto mamário, fortemente positivo (+++); por fim, 15 (31,3%) quartos foram fracamente positivos (+), seis (12,5%) nitidamente positivos (++) e um (2,1%) quarto fortemente positivos (+++), às 48 horas (Gráfico 1).

O CMT, que foi desenvolvido como teste secundário para se estimar o teor de células no leite de vacas, tem sido utilizado também no leite de búfalas, sendo assumido que a interpretação dos resultados deve ter a mesma interpretação adotada para vacas (SINGH *et al.*, 1982; DHAKAL, 1994; MORONI *et al.*, 2006; BORGHESE *et al.*, 2007; CAVALLINA *et al.*, 2008).

Segundo Lazzari (2014), os testes de CMT e CCS, rotineiramente utilizados para avaliar a sanidade da glândula mamária, apresentaram correlação entre si, com a cultura bacteriana positiva, nas duas espécies. Este resultado confirma a viabilidade dos testes utilizados rotineiramente para vacas na detecção da mastite em búfalas.

De acordo com Costa *et al.* (1995), o CMT é um método auxiliar de boa correlação com o exame microbiológico, porém o processo inflamatório pode não ser de origem infecciosa. Por outro lado, segundo esses autores, animais portadores de mastite infecciosa, dependendo do estágio, podem não apresentar reações positivas nos testes que detectam a presença de processo inflamatório e que são positivos ao exame microbiológico, revelando importante fonte de infecção, principalmente em relação à mastite contagiosa.

Já Kapronezai (2004) observou que a frequência de quartos negativos e com isolamento microbiológico foi maior do que a de quartos positivos e com isolamento de microrganismos, indicando que há elevada frequência de portadores ou que o teste de CMT não é um bom teste de triagem para mastite em bubalinos.

A contagem de células somáticas (CCS), sendo uma expressão direta da severidade do processo inflamatório, é um parâmetro usual para avaliação da saúde do úbere com relação à qualidade do leite e monitoramento de programas de controle de mastites (HARMON, 1994). Os valores médios das contagens de células somáticas no leite normal de búfalas apresentam resultados variáveis, situando-se

entre 50.000 e 375.000 células/mL, com média de 140.000 células/mL (SILVA; SILVA, 1994). Prasad *et al.* (1996) observaram que amostras individuais de leite de búfalas, no inverno e verão, tinham, respectivamente, cerca de 87% a 93% de CCS de, no máximo 250.000 células/mL; de 4% a 5% da CCS entre 250.000 e 500.000 células/mL, e apenas 2% das amostras no inverno com contagem maior do que um milhão de células/mL.

Quando avaliou-se os quartos mamários de acordo com a contagem de células somáticas, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos logo após o parto e às 48 horas pós-parto (Tabela 2).

Lopes (2011) relata contagem média de células somáticas, no momento do parto, de 338.000 cel/mL com decréscimo acentuado até o terceiro dia pós-parto, apresentando contagem média de 87.500 cel/mL. No presente estudo observou-se padrão contrário nas amostras provenientes de animais do grupo I, uma vez que a contagem de células somáticas, às 48 horas, foi significativamente maior que os valores obtidos nos momentos anteriores. O resultado observado pode ser explicado pela ausência de técnicas de manejo, durante a ordenha, visando evitar a contaminação da glândula mamária dos animais, o que, provavelmente, levou a contaminação do parênquima mamário por algum agente infeccioso, elevando, assim, a CCS.

O número de células somáticas dos animais do GI foram superiores, em todos os momentos, ao descrito por Bastos e Birgel (2011), que relataram contagem média de células somáticas do leite de búfalas, sem isolamento microbiano, de 42.000 cel/mL, fato esse esperado, uma vez que o colostro apresenta células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos B com a função de realçar mecanismos de defesa nos neonatos, aumentar a atividade linfocitária, estimular atividade fagocítica e bactericida no trato digestório e propiciar a transferência de imunidade passiva (GODDEN, 2008; CORTESE, 2009).

Medeiros *et al.* (2011) estudando o perfil de CCS em búfalas leiteiras no Nordeste do Brasil, com resultados positivos ao teste de CMT e exames microbiológicos, concluíram que contagem acima de 280.000 cél/mL é indicativa de infecção da glândula mamária. Bansal *et al.* (2007) observaram CCS em torno de 593.000 cél/mL em búfalas com mastite.

O manejo da ordenha adotado na propriedade era falho, apesar da existência de sistema automatizado. Não era realizado o teste da caneca de fundo

escuro (ou telada) e nem tão pouco se desprezava os primeiros jatos antes da colocação dos copos das teteiras. Não ocorria, também, a separação de vacas sadias daquelas com processos infecciosos e/ou inflamatórios da glândula mamária. Eram realizadas duas ordenhas diariamente. Somente ao final da ordenha o equipamento era higienizado com detergente específico, comprometendo, dessa forma, a assepsia da ordenha, já que não era feita a higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica, de vaca para vaca.

Segundo Ablas *et al.* (2007), quando os búfalos têm à disposição áreas sombreadas e água para imersão, os animais preferiam a água. Os bubalinos tendem a chafurdar durante o dia e fazer uma cobertura de lama em seus corpos antes do descanso noturno (PATHAK, 1992; GLASS, 2000), fato que podia ser nitidamente observado, pelo hábito que os animais demonstravam após as ordenhas, quando eram liberados para os piquetes, que mesmo não permitindo o acesso dessas búfalas a fontes de água como açudes, por exemplo, estes acabavam formando aberturas (covas) do solo com a água dos bebedouros, ou adentravam nos mesmos para aliviar os incômodos causados pelo calor e insetos (Figuras 1 e 2), o que não é recomendável, visto que os esfíncteres dos tetos permanecem pérvios por até 40 minutos, possibilitando a entrada de patógenos ambientais e secundários, os quais, neste estudo, foram os agentes mais frequentemente isolados nas amostras de colostro e leite.

Figura 1 - Fêmeas bubalinas em lactação deitadas em poças de lama procurando por conforto térmico.



Figura 2 – Búfalas buscando por conforto térmico dentro do cocho de água.



Devido à grande variabilidade de microrganismo que podem causar mastite, é essencial para o diagnóstico seguro que todas as amostras submetidas ao exame laboratorial sejam colhidas assepticamente e em frascos estéreis. Todos os requisitos de higiene e conservação para obtenção e armazenamento das amostras enviadas ao exame microbiológico para impedir o crescimento de contaminantes foram adotados no presente estudo. Houve o crescimento microbiano em somente quartos mamários dos animais do GII. Como discutido anteriormente, esses animais possuíam, logo após a parição, maiores valores de células somáticas do que os animais saudáveis, corroborando com a afirmação de que a presença de patógenos na glândula mamária promove aumento da CCS (FERDOWSKI NIA *et al.*, 2010; OSTRENSKY, 1999; SORDILLO; STREICHER, 2002)

O manejo correto na secagem dos animais é fundamental para o início da lactação sem a ocorrência de transtornos. Nessa fase, as defesas celulares da glândula mamária estão diminuídas, deixando-a à mercê de patógenos ambientais. Além da diminuição da atividade fagocítica de inúmeros componentes celulares, a produção do colostro aumenta a pressão intramamária, dilatando o esfíncter e canal dos tetos. Há, conseqüentemente, gotejamento da secreção colostrálica e a remoção da camada de queratina, deixando-os pérvios para a entrada de agentes patogênicos (SORDILLO; STREICHER, 2002).

As bactérias com maior frequência de isolamento (Tabela 1) assemelham-se às descritas por Bastos e Birgel (2011) que verificaram 28,5%, 24,7% e 15,8% e Costa *et al.* (1997), que constataram 59,25%, 17,59% e 12,96% para *Corynebacterium* spp, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp, respectivamente. García (2014) descreveu que os gêneros de bactérias envolvidos com maior prevalência com a mastite subclínica foram *Staphylococcus* spp. (32%) e *Bacillus* spp. (14%).

Medeiros *et al.* (2013) observaram incidência de 17,4% de mastite subclínica em búfalas, sendo que os agentes mais prevalentes o *Staphylococcus* spp (23,8%), seguido por *Corynebacterium* spp. (11,7%). No estado de São Paulo, em estudo realizado com fêmeas pluríparas e primíparas, observou-se incidência de 24,4% de mastite, sendo os *Staphylococcus* spp. (11,8%), *Corynebacterium* spp. (7,3%) e *Streptococcus* spp (3,1%), respectivamente, os agentes mais isolados.

Tabela 1 - Identificação microbiológica, frequência (%) e número absoluto de quartos mamários de búfalas com isolamento microbiológico em secreções colostrais colhidas imediatamente após o parto (GII).

Microorganismos	Frequência (número absoluto)
<i>Corynebacterium</i> spp.	28,6 (10)
<i>Streptococcus</i> spp.	34,2% (12)
<i>Staphylococcus</i> spp.	28,6% (10)
<i>Bacillus</i> spp.	5,7% (2)
<i>Bacillus cereus</i>	2,9% (1)
Total de isolamentos	35

Analisando o colostro de vacas da espécie bovina, Santos (2013) relatou que o *Streptococcus* spp foi o agente mais frequentemente isolado de quartos mamários de animais com mastite subclínica. Patógenos secundários, em especial, *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativa, têm se tornado os mais predominantes agentes causadores de mastite no Brasil e em diversos países.

Quando se avaliou os quartos mamários de acordo com a contagem de células somáticas (BANSAL *et al.*, 2010) constatou-se que não houve diferença significativa entre os grupos logo após e às 48 horas pós-parto (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiano positivo (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	CCS/mL (mediana)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	71.000aA	58.000aA	289.500b
GII	400.000B	406.000B	356.000

Valores seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Dunn e por letras maiúsculas diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney. $p < 0,05$.

Kapronezai (2004) relatou valores de mediana para CCS de 8.500/mL, 10.350/mL, e 9.600/mL, quando do isolamento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., respectivamente.

Lopes (2011) relata contagem média de células somáticas, no momento do parto, de 338.000 cel/mL com decréscimo acentuado até o terceiro dia pós-parto, apresentando contagem média de 87.500 cel/mL. No presente estudo observou-se padrão contrário nas amostras provenientes de animais do GI, uma vez que a contagem de células somáticas, às 48 horas, foi significativamente maior que os valores obtidos nos momentos anteriores.

Pizauro *et al.* (2014), em estudo realizado no estado de São Paulo, observaram que búfalas com mastite subclínica apresentavam CCS média de 190×10^3 cél/mL durante o período chuvoso. Segundo Lazzari *et al.* (2014), as búfalas denotavam elevação da CCS decorrente de mastite assim como em bovinos, porém de forma mais discreta, indicando que as búfalas, possivelmente, desenvolvem processo inflamatório menos severo em relação às fêmeas da espécie bovina.

Os valores do presente estudo não apresentaram diferença significativa entre os momentos no GII; contudo, foram significativamente maiores após a parição e às 24 horas do que os obtidos nos animais do GI, decorrente, provavelmente, da presença de microrganismos, o que desencadeou resposta de mecanismos de defesa no parênquima mamário, fazendo com que o número de células somáticas se mantivesse elevado.

5.2 Concentração de proteína total em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.

Os valores médios de proteína total obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de proteína total (PT) em amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	PT (g/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	7,9 ± 4,00a	4,2 ± 1,37a	2,4 ± 0,96bA
GII	8,3 ± 2,60a	5,4 ± 1,89b	3,0 ± 0,64cB

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste t-Student. $p < 0,05$.

Verificaram-se maiores concentrações de proteína total do soro lácteo de búfalas acometidas por mastite subclínica, quando comparadas às de animais saudáveis no dia do parto. Sant'ana (2004) e Santos (2013) observaram valores superiores em animais com mastite clínica quando comparados com animais sadios. Com o decorrer do tempo houve queda significativa na concentração de PT, tanto dos animais do GI como dos GII, fato esperado pela alta concentração de proteínas presentes no colostro, representada, principalmente, pelas imunoglobulinas.

Tal diferença pode ser explicada pelo aumento da PT no soro lácteo devido à intensa transudação de moléculas oriundas do plasma para o interior da glândula mamária inflamada, decorrente do aumento da permeabilidade vascular local (KITCHEN, 1981).

Os valores médios de PT obtidos de amostras séricas dos bezerros provenientes do GI e GII estão representados na Tabela 4.

Um dos objetivos desse experimento foi verificar se a ingestão de colostro com isolamento microbiano causaria ou não falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em recém-nascidos. Segundo Barrington e Parish (2001), a avaliação da transferência de imunidade inata deve ser realizada, preferencialmente, entre 24 e 48 horas de vida, período em que ocorre maior concentração das

imunoglobulinas maternas no soro sanguíneo do neonato. A determinação da ocorrência ou não de FTIP neste período é importante do ponto de vista clínico, já que viabilizaria a imediata intervenção veterinária, minimizando os possíveis riscos de infecções. A não ingestão de colostro em bezerros recém-nascidos é a principal causa de FTIP. A FTIP pode atingir até 40% dos bezerros (BARRAGRY, 1997). A PT pode ser usada como ferramenta a fim de se avaliar a eficiência da transferência de imunidade passiva.

Tabela 4 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de proteína total (PT) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	PT (g/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	3,7 ± 0,59a	6,5 ± 1,49b	6,3 ± 1,58b
GII	3,6 ± 0,72a	5,3 ± 1,06b	5,5 ± 1,05b

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Os resultados obtidos são concordantes aos de Singh e Ahuja (1993) que observaram valores de 3,46 g/dL em bezerros bubalinos antes da ingestão do colostro, e com Fagliari *et al.* (1998), que descreveram teor sérico de proteína total, em bezerros bubalinos, de 6,33 g/dL após a absorção das proteínas colostrais e de Clemente (2012) que relatou valores de 8,0 g/dL para bezerros sadios ao longo do primeiro mês de vida. Denotou-se diferença significativa nos valores de proteína total ao nascimento com os demais momentos. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos nos respectivos momentos, indicando, do ponto de vista meramente estatístico, que não houve prejuízo na transferência de imunidade aos animais alimentados com colostro com isolamento microbiológico positivo. Todavia, os teores séricos de proteína total foram maiores nos bezerros oriundos de vacas sem isolamento microbiano às 24 e às 48 horas de vida. As concentrações médias de PT dos recém-nascidos oriundos de vacas com isolamento demonstraram falha parcial de transferência de imunidade passiva, ao contrário daqueles originados de vacas com glândulas mamárias sadias que apresentaram níveis satisfatórios para a referida variável (Tabela 3).

Vale ressaltar que os bezerros bubalinos do GII se alimentavam das secreções colostrais de todos os quartos mamários, ou seja, com colostro com isolamento e sem isolamento, visto que nenhuma das fêmeas do grupo II apresentava contaminação bacteriana em todos os quartos mamários.

5.3 Concentração de imunoglobulina G em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.

Os valores médios de IgG obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 5.

A IgG é a mais representativa dos anticorpos presentes no colostro bovino, representando cerca de 85-90% do total de imunoglobulinas. Esse isótopo atravessa a barreira existente entre a glândula mamária e a corrente sanguínea, onde se origina, para incorporar-se ao colostro (LARSON *et al.*, 1980). Essa imunoglobulina tem papel principal na transferência de imunidade passiva devido à sua ação de identificar e destruir os patógenos aos quais o neonato é exposto nos primeiros momentos de vida (TIZARD, 2008).

Os valores encontrados no presente experimento foram superiores aos descritos por Pizauro *et al.* (2014) que relataram concentrações médias de IgG no soro lácteo de búfalas sadias no início da lactação entre 17,0 – 25,4 mg/dL, haja vista que a IgG apresenta maior concentração no colostro por sua importância na transferência de imunidade passiva.

Sordillo *et al.* (1997) relataram maior produção dessas proteínas durante a mastite. Esses mesmos autores afirmaram que as elevadas concentrações dependiam da quantidade de células produtoras dessas moléculas na glândula mamária e do grau de permeabilidade da barreira do parênquima glandular. Sant'ana (2004) observou valores de imunoglobulinas superiores em animais com mastite clínica quando comparado a animais sadios. O mesmo pode ser observado nos animais do GII, onde os valores de IgG foram maiores quando comparados aos animais do GI, discordando de Maunsell *et al.* (1998) que não denotaram diferenças significativas entre os valores de animais com e sem infecção persistente na glândula mamária.

Constatou-se, também, declínio significativo ao longo do tempo nas concentrações dos animais de ambos os grupos, fato que demonstra a importância

da IgG no processo de transferência de imunidade passiva, quando se verificam elevados valores na fase colostrar (ROCHA, 2010), os quais diminuem rapidamente, atingindo valores mínimos no leite (GEORGIEV, 2008). As secreções colostrais aferidas no presente trabalho demonstraram ser menores do que às observadas para fêmeas da espécie bovina. Apesar disso, não foram constatadas ocorrências de doenças nos bezerros bubalinos ao longo do experimento, talvez em decorrência da maior rusticidade e resistência dos mesmos aos patógenos ambientais.

Tabela 5 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina G (IgG) das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IgG (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	3310,8 ± 1557,3a	1652,3 ± 979,4bA	1062,4 ± 567,9c
GII	4527,1 ± 1517,7a	2910,6 ± 1056,7aB	1329,9 ± 544,9b

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste t-Student. $p < 0,05$.

Os valores médios de IgG obtidos de amostras séricas dos bezerros estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina G (IgG) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IgG (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	864,6 ± 101,3a	2374,5 ± 939,4b	2353,5 ± 1135,3b
GII	842,5 ± 263,7a	1802,7 ± 556,3b	1710,9 ± 639,3b

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Os bezerros são agamaglobulinêmicos ao nascimento e dependem das imunoglobulinas presentes no colostro (GODDEN, 2008). Portanto, este é de grande importância à transferência da imunidade passiva (CORTESE, 2009). Somente poucas horas após a ingestão do colostro é que suas concentrações elevam-se (ECKERSALL, 2008). A ingestão do colostro não implica em transferência de

anticorpos adequada, pois aspectos como a qualidade colostrálica e tempo entre o nascimento e a ingestão do colostro são fatores relevantes a serem considerados (BESSER; GAY, 1994).

Às 24 horas denotou-se aumento nos níveis séricos dessa imunoglobulina, indicando que a ingestão do colostro foi fundamental para a sua aquisição. Não foi observada diferença estatística entre os grupos quanto às concentrações de IgG. Todavia, verificou-se que os bezerros oriundos de vacas sadias possuíam, às 24 e às 48 horas de vida, maiores teores de IgG, sugerindo que o processo inflamatório na glândula mamária, algumas vezes, resultaria em maior concentração de proteínas no colostro e menor taxa de transferência de IgG para o recém-nascido. Os valores encontrados no presente estudo, às 24 e 48 horas de vida, são semelhantes aos descritos por Clemente (2012), 1869 ± 816 mg/dL para bezerros bubalinos no primeiro mês de vida.

Johnson *et al.* (2007) constataram valores de IgG de 1810 ± 120 mg/dL, às 24 horas de vida, em bezerros da raça holandesa que ingeriram colostro com cultivo microbiano, semelhante aos observados no presente estudo. Acredita-se que os microrganismos se liguem aos receptores de anticorpos presentes nos enterócitos, reduzindo, assim, o número de estruturas responsáveis pela captação e absorção das imunoglobulinas (JOHNSON *et al.*, 2007).

5.4 Concentração de imunoglobulina A em secreções lácteas de búfalas e séricos de bezerros bubalinos.

Os valores médios de IgA obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 7.

Os valores obtidos para IgA não apresentaram diferença significativa entre os grupos, contudo notou-se que a concentração média decresce significativamente ao longo do tempo em ambos os grupos, corroborando as descrições de Santos (2013) que apontou decréscimo das concentrações da referida imunoglobulina quando da avaliação de secreções lácteas de fêmeas bovinas sadias e com mastite.

A IgA é produzida pelos plasmócitos da glândula mamária e transmitida, pelo colostro, para o neonato. É a principal imunoglobulina no colostro das diferentes espécies de mamíferos, exceto nos ruminantes, onde representa, aproximadamente,

5% das imunoglobulinas (LARSON *et al.*, 1980). Kehoe *et al.* (2007) observaram valores de 166mg/dL nos teores de IgA no colostro de vacas holandesas por meio da técnica de imunodifusão radial. Pizauro *et al* (2014), por sua vez, publicaram valores médios de 0,57 mg/dL em búfalas em diferentes fases da lactação, valores esses, bem abaixo dos observados no presente estudo.

Tabela 7 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina A (IgA) das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IgA (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	851,4 ± 475,6a	364,1 ± 208,2b	230,2 ± 78,0b
GII	590,7 ± 224,0a	364,3 ± 99,4b	226,8 ± 92,8c

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Os valores médios de imunoglobulina A (IgA) obtidos de amostras séricas dos bezerros estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de imunoglobulina A (IgA) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IgA (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	370 ± 150a	580 ± 260ab	630 ± 190b
GII	360 ± 170a	650 ± 190b	640 ± 210b

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

As concentrações séricas da imunoglobulina A (IgA) foram superiores às 24 horas, permanecendo constantes até às 48 horas, no GII, enquanto que no GI apresentaram-se significativamente maiores às 48 horas de vida. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ao longo do período experimental para os níveis circulantes dessa imunoglobulina. Johnson *et al.* (2007) constataram padrão sérico similar em bezerros alimentados com colostro contaminado e estéril, às 24 horas de vida. A IgA representa cerca de 5% do total de anticorpos presentes no colostro (TIZARD, 2008). Por representar uma pequena parcela, as alterações em

sua concentração mostram-se pouco significante do ponto de vista clínico (JOHNSON *et al.*, 2007).

Fagliari *et al.* (2006) utilizando a técnica de SDS-PAGE, observaram valores séricos de bezerros saudáveis da raça holandesa entre 262,60 e 409,86 mg/dL, às 48 horas de vida. Os resultados apresentados nessa pesquisa, portanto, encontram-se inseridos nesse intervalo de variação.

Clemente (2012), também utilizando a técnica de SDS-PAGE, relatou valores entre 304 a 412 mg/dL em bezerros bubalinos sadios nos primeiros 30 dias de idade, estando ligeiramente menores aos encontrados no presente estudo após a ingestão do colostro (24 e 48 horas de vida)

5.5 Concentração de lactoferrina em secreções lácteas das búfalas e séricos dos bezerros bubalinos.

Os valores médios de lactoferrina (LF) obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de lactoferrina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	Lactoferrina (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	545,1 ± 351,6A	274,1 ± 134,8A	147,0 ± 85,4
GII	166,2 ± 106,9B	85,1 ± 62,1B	126,8 ± 100,3

Valores seguidos de letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste t-Student. $p < 0,05$.

Os valores médios encontrados diferem entre os grupos às 0 e às 24 horas, sendo mais elevados nos animais do GI. Santos (2013) descreveu valores significativamente maiores de lactoferrina em vacas holandesas portadoras de mastite clínica e subclínica quando comparadas às vacas sadias, padrão oposto ao descrito no presente experimento. Quando se comparou os valores de LF com os descritos por Santos (2013) obtidos no colostro de fêmeas bovinas sadias sem com mastite, observa-se que as fêmeas bubalinas apresentaram concentração menor de

LF, contrariando a afirmação de Bhatia e Valsa (1994b), que descreveram que o leite bubalino possui quantidade de lactoferrina superior ao do leite bovino.

A LF é uma glicoproteína produzida pelos neutrófilos (ARNOLD *et al.*, 1980) e exerce importante papel na proteção da glândula mamária, uma vez que esta proteína sequestra o ferro tornando-o indisponível para microorganismo e dificultando o crescimento destes (NEWMAN *et al.* 2009).

De acordo com Bhatia e Valsa, (1994a) a concentração de LF colostrar pode atingir níveis duas vezes maiores do que os encontrados no início do período lactante, tendo, tanto em vacas como em búfalas, padrão semelhante ao observado nos animais do GI, onde verificou-se decréscimo constante durante o período avaliado. É possível que essa variação esteja correlacionada à necessidade de maior proteção antibacteriana nesse período.

5.6 Concentração de albumina em secreções lácteas de vacas bubalinas

Os valores médios de albumina obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de albumina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	Albumina (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	392,1 ± 300,9	366,4 ± 129,7	166,3 ± 72,3
GII	497,0 ± 211,1a	314,0 ± 102,3b	173,1 ± 110,0c

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Constatou-se diferença significativa dos resultados somente entre os momentos dos animais do GII, com decréscimo dos valores com o decorrer do tempo. No presente estudo os animais do GII apresentaram teores ligeiramente superiores, indicando possível processo inflamatório decorrente da estimulação bacteriana constatada por meio do cultivo microbiológico. Santos (2013) observou valores nitidamente maiores na secreção colostrar de vacas com mastite clínica, com declínio ao longo do período avaliado.

Segundo Bounous (2000), o aumento dessa fração proteica está intimamente ligado à presença do processo inflamatório na glândula mamária, já que essa molécula participa da defesa do úbere, apresentando função antioxidante, por agir nos radicais livres oriundos do processo inflamatório. Sua concentração aumenta em algumas situações em que a glândula mamária é exposta, como, por exemplo, durante a mastite subclínica e clínica, onde ocorre o processo inflamatório com elevação da concentração de albumina, em decorrência do aumento de permeabilidade vascular e, conseqüente, extravasamento para o tecido (RIOLLET *et al.*, 2000; SANT'ANA *et al.*, 2006).

Os valores médios de albumina obtidos de amostras séricas dos bezerros estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de albumina em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	Albumina (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	1606,5 ± 430,7	2043,5 ± 738,0	2037,7 ± 653,6
GII	1204,6 ± 414,1	1431,7 ± 459,6	1573,7 ± 420,7

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Não foi denotada diferença significativa entre os grupos quanto aos teores de albumina sérica. Observou-se que os animais do GII apresentaram valores mais constantes de albumina nos diferentes momentos, enquanto que os animais do GI possuíam leve aumento do valor médio às 24 horas de vida, mantendo-se até as 48 horas. González *et al.* (2008) descreveram redução dos teores séricos de albumina em cabras submetidas à inflamação experimental dois dias após a indução do estímulo, e o retorno à sua concentração normal no terceiro dia, contrariando com os resultados descritos nesse trabalho, uma vez que os animais alimentados com colostro/leite de vacas com mastite apresentavam valores médios menores de albumina, porém sem diferença estatística. Tendo em vista que as proteínas de fase aguda apresentam respostas diferentes entre as espécies animais, é provável que a cinética da referida proteína seja diferente em pequenos ruminantes quando comparado com os bubalinos (TIZARD, 2008).

Clemente (2012) relatou valores superiores aos encontrados no presente experimento, entre 3926 e 4000 mg/dL em bezerros bubalinos saudáveis, não demonstrando alteração significativa nos grupos experimentais infectados por *S. typhimurium*.

Santos (2013) relatou que os valores de albumina mantiveram-se constantes no grupo de vacas com mastite clínica. O mesmo padrão de resposta foi observado no presente experimento.

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, com peso molecular de aproximadamente 66,4kDa. Sua concentração sérica diminui em resposta aos processos inflamatórios crônicos. Sua concentração é cerca de 35 a 50% do total de proteínas séricas. Devido à sua abundância no soro, é responsável, também, pela pressão osmótica (ECKERSALL, 2008).

5.7 Concentração de β -lactoglobulina em secreções lácteas de vacas bubalinas.

Os valores médios de β -lactoglobulina obtidos de amostras de secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano, estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) de β -lactoglobulina das amostras de colostro e leite das búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	β -lactoglobulina (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	1441,0 \pm 1245,6ab	884,2 \pm 332,0a	536,5 \pm 304,7b
GII	1123,3 \pm 463,5a	849,9 \pm 348,1ab	512,7 \pm 129,5b

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Constatarem-se maiores valores de β -lactoglobulina nas secreções obtidas logo após a parição, com progressiva redução ao longo do período de 48 horas, em vacas de ambos os grupos. Tal fato foi observado por Pizauro *et al.* (2014) que descreveram diminuição da referida proteína com o avançar da lactação.

Santos (2013) observou, também, que não houve diferença entre a concentração de β -lactoglobulina quando se comparou vacas com e sem mastite,

sendo que os valores encontrados no colostro eram significativamente maiores do que os observados no leite, corroborando com o observado no presente experimento.

Segundo Sawyer (2003), a β -lactoglobulina pode desempenhar um papel importante no metabolismo de fosfato na glândula mamária, no transporte de vitamina A e de outras moléculas no trato gastrointestinal de neonatos.

5.8 Concentração sérica de transferrina em bezerros bubalinos

Os valores médios de transferrina obtidos de amostras séricas dos bezerros estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios (x) e desvios-padrão (S) transferrina em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	Transferrina (mg/dL)		
	0 hora	24 horas	48 horas
GI	37,97 ± 14,15	62,13 ± 23,73	56,64 ± 19,33
GII	43,89 ± 10,39	50,81 ± 12,45	52,28 ± 8,58

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey. $p < 0,05$.

Não se constatou diferença significativa entre os grupos e entre os momentos estudados. Santos (2013) observou que bezerros bovinos alimentados com colostro de glândulas com mastite apresentavam concentrações constantes de transferrina, porém significativamente menores, às 24 horas, do que os animais alimentados com colostro de vacas sadias. Já Rocha (2010) não observou diferenças significativas no teor dessa proteína entre bezerros oriundos de novilhas e vacas pluríparas da raça Canchim, e nem em diferentes momentos durante as primeiras 48 horas de vida desses animais. Da mesma forma, Knowles *et al.* (2000) avaliando 14 bezerros sadios de diferentes raças de corte, verificaram diminuição gradual, em torno de 25% a 15%, dos níveis séricos de transferrina, do nascimento aos três dias de vida, contrariando a cinética dessa proteína observada no presente experimento.

Clemente (2012) registrou valores entre 448 e 594 mg/dL em bezerros bubalinos sadios, sendo muito superiores aos encontrados no presente experimento.

O mesmo autor também relatou declínio da concentração sérica de transferrina em bezerros infectados por *S. typhimurium*.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, produzida pelos hepatócitos, e que apresenta concentração diminuída após infecção. Sua baixa secreção pelas células hepáticas acarreta na redução dos níveis séricos de ferro, essencial para a replicação bacteriana (GRUYS *et al.*, 2005). Infecções crônicas, neoplasias, anemias e inflamações podem causar redução em seus níveis (FUHRMAN *et al.*, 2004). Além de estar presente no soro sanguíneo, essa proteína também aparece no colostro das espécies ruminantes e realiza a mesma função que a descrita para o sangue (SANCHEZ *et al.*, 1992).

5.9 Concentração de IL-6 e TNF- α das secreções lácteas de búfalas e séricos dos bezerros bubalinos.

Os valores medianos observados nas secreções lácteas de búfalas, com e sem isolamento microbiano para IL-6 e TNF- α , estão representados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14 - Valores medianos das concentrações de IL-6 (pg/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IL-6 (pg/mL)					
	0H		24H		48H	
	Md	Min-Max	Md	Min-Max	Md	Min-Max
GI	14,97a	13,32-29,4	21,97abA	13,68-81,74	32,15b	14,66-80,04
GII	15,42a	13,42-15,99	15,61aB	12,96-18,92	27,03b	13,84-55,46

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Dunn e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste de Mann-Whitney. $p < 0,05$.

No presente estudo, observou-se, em ambos os grupos, que os valores de IL-6 às 48 horas eram significativamente maiores do que aqueles obtidos logo após o parto, sendo significativamente maior no G1, às 24 horas pós-parto, entre os grupos.

Já os valores observados de TNF- α não apresentaram diferença significativa quando comparado entre os grupos, porém os animais do GI eram

possuidores de valores significativamente maiores às 24 e 48 horas pós-parto, quando comparados aos observados logo após a parição. Os animais do GII possuíam valores significativamente maiores, às 48 horas pós-parto, aos observados logo após o nascimento (0 h) e às 24 horas pós-parto.

Tabela 15 - Valores medianos das concentrações de TNF- α (pg/mL) em amostras de colostro e leite de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	TNF- α (pg/mL)					
	0H		24H		48H	
	Md	Min-Max	Md	Min-Max	Md	Min-Max
GI	16,13a	12,68-41,32	28,06b	14,32-136,12	47,49b	15,42-131,90
GII	16,64a	13,8-27,76	16,36a	13,68-29,94	42,37b	15,30-133,68

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Dunn e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste de Mann-Whitney. $p < 0,05$.

Os valores de IL-6 e TNF- α obtidos no presente estudo no grupo das búfalas com crescimento negativo de microrganismos foram maiores do que os descritos por Santos (2013) para vacas pluríparas sadias, logo após o parto (1,4 pg/mL; 2,5 pg/mL) como às 24 (1,99 pg/mL; 2,5 pg/mL) e 48 horas (5,05 pg/mL; 7,04 pg/mL) subsequentes. Porém, o autor supracitado descreve valores maiores de IL-6 e TNF- α , no grupo de vacas com mastite clínica, aos encontrados no grupo de búfalas com isolamento bacteriano positivo, às 24 e 48 horas pós-parto.

Madureira (2011), por outro lado, descreveu valores séricos medianos para colostro de vacas sadias de 31,3 e 39,2 pg/mL e médios de 33,4 e 80,0 pg/mL, para IL-6 e TNF- α , respectivamente.

Segundo Vels *et al.* (2009), a presença de processo inflamatório na glândula mamária estimula a produção das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6; contudo, Hagiwara *et al.* (2000) constataram a presença de TNF- α e IL-6 em células isoladas do colostro de bovinos, independente da presença de agente patogênico.

De acordo com Wenz *et al.* (2010), vacas naturalmente infectadas por bactérias Gram-positivas apresentavam baixos valores de TNF- α , sendo que as mesmas foram detectáveis em apenas 29% dos animais.

Segundo Bannerman (2009), o aumento na concentração de TNF- α em animais acometidos por mastite por *S. uberis*, foi evidente por volta de 66 horas após o estímulo inflamatório. De acordo com o autor, a concentração máxima obtida para a referida citocina estava muito aquém daquela obtida em casos de mastite causada por bactérias gram-negativas.

Bannerman *et al.* (2009) encontraram diferentes padrões de produção de citocinas entre infecções com *E. coli* e *S. aureus* em bovinos. No caso de infecção com a primeira, há produção de IL-8 e TNF- α , o que não ocorre na infecção com o último agente. Isso explica, em parte, a maior capacidade do *S. aureus* no desenvolvimento de mastites crônicas, quando comparado com coliformes.

A expressão da IL-6 é marcante tanto em infecções mamárias por agentes Gram-positivos e Gram-negativos, principalmente *E.coli*, *S. aureus* e em algumas espécies de *Streptococcus* (BANNERMAN, 2009).

Os valores medianos observados para IL-6 e TNF- α em amostras sanguíneas de recém-nascidos, filhos de búfalas com e sem isolamento microbiano em secreções lácteas, estão representados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16 - Valores medianos das concentrações de IL-6 (pg/mL) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	IL-6 (pg/mL)					
	0H		24H		48H	
	Md	Min-Max	Md	Min-Max	Md	Min-Max
GI	7,07	5,70-10,26	6,80A	2,70-7,29	7,23	6,57-7,53
GII	6,89	6,19-8,80	7,15B	6,29-8,19	7,09	6,26-12,10

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Dunn e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste de Mann-Whitney. $p < 0,05$.

No presente estudo observou-se que os bezerros bubalinos apresentavam concentrações séricas de IL-6 e TNF- α mesmo antes de mamarem o colostro, contrariando o descrito por Santos (2013) e Yamanaka *et al.* (2003) que não detectaram teores de citocinas em amostras sanguíneas de bezerros antes que ocorresse a ingestão de colostro.

Tabela 17 - Valores medianos das concentrações de TNF- α (pg/mL) em amostras de soro sanguíneo de bezerros filhos de búfalas sem (GI) e com isolamento microbiológico (GII), imediatamente após o parto (0h), às 24 e às 48 horas, após o referido evento.

Grupos	TNF- α (pg/mL)					
	0H		24H		48H	
	Md	Min-Max	Md	Min-Max	Md	Min-Max
GI	6,90	0-12,77	5,95A	0-9,37	7,29	0-8,64
GII	7,32	5,85-10,47	7,29B	6,00-9,89	7,65	0-14,85

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre si, na linha, pelo teste de Dunn e por letras maiúsculas diferem entre si, na coluna, pelo teste de Mann-Whitney. $p < 0,05$.

Os valores observados de IL-6 e TNF- α , às 24 horas de vida dos bezerros do GII foram significativamente maiores do que os valores observados nos bezerros do GI.

Na literatura parece não existir consenso entre a gravidade da lesão inflamatória e as concentrações séricas de IL-6. Animais que morreram devido à mastite clínica severa apresentaram teores séricos maiores do que animais que sobreviveram (HAGIWARA *et al.*, 2001). Contudo, outros autores reportaram tendência inversa nas concentrações séricas (NAKAJIMA *et al.*, 1997) ou não observaram diferenças nas concentrações sanguíneas de IL-6 de animais com mastite branda e/ou severa (OHTSUKA *et al.*, 2001).

Quando comparados os resultados do presente experimento com os descritos pela literatura pode-se notar que bezerros bubalinos apresentaram maiores valores, tanto ao nascimento como às 24 horas de vida, do que os descritos para a espécie bovina. Madureira (2011) observou teores medianos de 1,08 pg/mL para a IL-6, 24 horas após a ingestão de colostro. Esse mesmo autor descreveu valores de 2,30pg/mL para TNF- α no referido período. Santos (2013) mencionou resultados medianos de IL-6 de 1,40 pg/mL para bezerros oriundos de vacas primíparas e pluríparas, às 24 horas de vida, e de 2,50 pg/mL para TNF- α em bezerros oriundos de vacas primíparas e pluríparas, no período supracitado.

6 Conclusões

Diante das condições experimentais estabelecidas, conclui-se, que:

A contagem de células somáticas e o California Mastitis Test mostram-se como importantes indicadores da ocorrência de mastite subclínica, porém baixos valores de CCS e/ou resultados negativos do CMT não implicam, necessariamente, na ausência de infecção intramamária;

A presença de agentes microbianos provocou discretas alterações físicas no parênquima mamário e nas características macroscópicas das secreções lácteas das búfalas;

Os agentes microbianos isolados nas amostras de colostro foram *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp e *Bacillus cereus*, sendo o *Streptococcus* spp. o mais comumente isolado;

A ingestão de colostro de vacas bubalinas com mastite subclínica não influencia a transferência de imunidade passiva para os bezerros;

As concentrações de IL-6, TNF- α , PT, IgG e IgA não diferem em búfalas com e sem isolamento microbiano em suas secreções lácteas;

Bezerros que ingeriram colostros positivos ao cultivo possuem maiores teores de IL-6, TNF- α e menores concentrações de PT e IgG.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.
- ABLAS, D. S.; TITTO, E. A. L.; PEREIRA, A. M. F.; TITTO, C. G.; LEME, T. M. C. Comportamento de bubalinos a pasto frente a disponibilidade de sombra e água para imersão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 167-175, 2007.
- ARAÚJO, D. K. G; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, p.77-83, 2005.
- ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. **Infection and Immunity**, v. 28, n.3, p. 893-898, 1980.
- BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **J Anim Sci**, v. 87, n. 13 Suppl, p. 10-25, 2009.
- BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; LIND, O.; SINGH, S. T.; DHALIWAL, P. S. Somatic cell count and biochemical components of milk related to udder health in buffaloes. **Italian Journal of Animal Science**. v. 6, p. 1035–1038, 2007
- BANSAL, B. K.; HAMMAN, J.; LIND, O. 2010. "Milk Production. Determination of on-farm direct cell count and biochemical composition of milk in buffaloes." **In Proceedings of the 9th World Buffalo Congress**. Argentina.
- BASTOS, P. A. S.; BIRGEL, E. H. Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação**

Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, São Paulo, v.9, n.3, p.06-13, 2011.

BENESI, F. J. Estudo das citocinas do colostro e do sangue de vacas holandesas. Efeito de *Escherichia Coli* enterotoxigenica (ECET) sobre os fagócitos. Projeto de Pesquisa. 2009.

BENESI, F. J. Síndrome asfixia neonatal nos bezerros: importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 16, n. 1, p. 38-48, 1993.

BERNARDES, O. Produção de búfalas leiteiras. *In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA SIMLEITE*, 4., 2013, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. p. 279-315.

BESSER, T. E.; GAY, C. C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **Vet. Clin North Am. Food Anim.**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 107-117, 1994.

BHATIA, K. L.; VALSA, C. Changes in buffalo lactoferrin level in milk during lactation. *In: WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., 1994, São Paulo, SP. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994a. p. 159-161.

BHATIA, K. L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo milk. *In: WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994b. p. 162-164.

BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. *In: FEITOSA, F. L. F. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo: Roca, 2004. p. 353-399.

BIRGEL JUNIOR, E. H. **Características físicoquímicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Gir e Girolando**

criados no Estado de São Paulo. 2006. 335 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BORGUESE, A., MAZZI, M. **Buffalo population and strategies in the world**. In: BOEGUESE, A. Buffalo production and research. Roma: FAO, 2005. p. 1-40.

BORGHESE, A.; RASMUSSEN, M.; THOMAS, C. S. Milking management of dairy buffalo. **Italian J Anim Sci**, v. 6, p.3950, 2007.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 20, n. 6C, p. 4785–4792, 2000.

BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 463-476, 2001

BRAMBELL, F. W. R. The passive immunity of the young mamal. **Biol. Rev.**, v. 33, p. 488-91, 1958.

CAVALLINA, R.; RONCORONI, C.; CAMPAGNA, M. C.; MINERO, M.; CANALI, E. Buffalo behavioural response to machine milking in early lactation. **Italian J Anim Sci**, v. 7, p. 287-295, 2008.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; JURADOGÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2885-2889, 2002.

CLEMENTE, V. **Infecção experimental com Salmonella typhimurium em bezerros bubalinos: estudo clínico, laboratorial e terapêutico**, 2012. 147 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Média Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, 2012.

CORTESE, V.S. Neonatal Immunology. **Vet. Clin. Food Anim.**, v. 25, p. 221-227, 2009.

COSTA, E. O.; GARINO, F.; WATANABE, JR. E. T.; RIBEIRO VEZON, P.; BARUSELLI, P.S.; PASKE A. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds (*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira (Ribeira River Valley) São Paulo. Brazil. **Proc. 5th World Buffalo Congress**, Caserta, Italy. 635-638. 1997.

COSTA, E. O.; MELEVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; WHITE, C. R., PARDO, R. B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 215-217, 1995.

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, v.73, p.17-21, 2006.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAÚJO, W. P.; KITAMURA, S. S.; ROSENFELD, A. M. F.; BIRGEL, E. H. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, **Brasil. Cien. Rur.**, v. 34, p. 1087-1092, 2004.

DAVIDSON, A. P. Approaches to reducing neonatal mortality in dogs. In: CONCANNON, P. W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J., LINDEFORSBERG, C. **Recent advances in small animal reproduction**. New York: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/concannon/Davidson/Chapter>. Acesso em: 05 de mar. 2010.

DANG, A. K.; KAPILA, S.; PUROHIT, M.; SINGH, C. changes in colostrums of Murrah buffaloes after calving. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 41, p. 1213-1217, 2009.

DHAKAL, I. P. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes at drying off and post calving stages. **Vet Review**, v. 9, p.18-22, 1996.

DHAKAL, I. P.; DHAKAL, P.; KOSHIHARA, T.; NAGAHATA, H. Epidemiological and bacteriological survey of buffalo mastitis in Nepal. **J. Vet. Med. Sci.**, v.69, p.1241-1245, 2007.

DIESCH, T. J.; MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J.; WARD, R. N. The physiological and physical status of single calves at birth in dairy herd in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n. 5, p. 250- 255, 2004.

DIRKSEN G.; GRÜNDER H-D.; STÖBER M. Rosenberger. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1993. 419 p.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clínical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-155.

FAGIOLO A.; RONCORONI, C.; LAI O.; BORGUESE, A. Buffalo pathologies. *In*: BORGUESE, A. **Buffalo production and research**. Roma: FAO, 2005. p. 249-196.

FAGLIARI, J.J.; SANTANA, A.E.; LUCAS, F.A. et al. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.50, p.253-262, 1998.

FAGLIARI, J. J.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 450-453, 2006.

FLEENOR, W. A.; STOTT, G.H. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. **J. Dairy Sci.**, v. 63, p. 873–977, 1980.

FRANCIOSI, C.; ROCHA, T. G.; ERNANDES, P. P.; NOGUEIRA, C. A. S.; BARBOSA, J. C.; FAGLIARI, J. J. Teores De Minerais e Atividade Da Enzima Gamaglutamiltransferase no Soro Colostral de Vacas das Raças Canchim e Holandesa e Influência do Número de Lactações. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, 2009 - VIII Congresso Brasileiro de Buiatria – ANAIS

FERDOWSKI, E.; GHORBANI, G. R.; RAHMANI, H. R.; ALIKHANI, M.; MOHAMMAD ALIPOUR, M.; NIKKHAH, A. Increased colostral somatic cell counts reduce pre-weaning calf immunity, health and growth. **Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition**, v. 94, n. 5, p. 628-634, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acesso em: 17 de janeiro, 2014.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 104, n. 8, p. 1258-1264, 2004

GARCÍA, A. V. **Avaliação, isolamento e identificação dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica em búfalas**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GLASS, V. Búfalos: cenário adequado. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, n. 177, p. 46-52, 2000.

GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Vet Clin Food Anim**, v. 24, p. 19-39, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SOLER, L.; CERÓN, J. J. Acute Phase Protein Response in Goats. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 20, n. 5, p. 580-584, 2008.

GOTO, M.; MARUYAMA, M.; KITADATE, K.; KIRISAWA, R.; OBATA, Y.; KOIWA, M.; IWAI, H. detection of interleukin-1b in sera and colostrums of dairy cattle and in sera of neonates. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 6, p. 437-441, 1997.

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

GRUNERT, E. Sistema genital feminino *In*: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H-D.; STÖBER, M. Rosenberger. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

HAGIWARA, K.; KATAOKA, S.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Detection of cytokines in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, n.3-4, p. 183-190, 2000.

HAGIWARA, K.; YAMANAKA, H.; HISAEDA, K.; TAHARAGUCHI, S.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. **Vet. Res. Commun**, v. 25 p. 99–108, 2001.

HISAEDA, K.; HAGIRAWA, H.; EGUCHI, J.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Interferon-g and Tumor Necrosis Factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring Coliform Mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 1009-1011, 2001.

HARMON, R. J. Symposium : mastites and genetic evaluation for somatic cell count. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da pecuária Municipal, Volume 44. 2016.

JAINUDEEN, M. R., HAFEZ, E. S. E. Gestation, prenatal physiology and parturition. *In*: HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 6ed. Philadelphia: Lea&Febiger, 2000. p. 213-136.

JOHNSON, J. L.; GODDEN, S. M.; MOLITOR, T.; AMES, T.; HAGMAN, D. Effects of Feeding Heat-Treated Colostrum on Passive Transfer of Immune and Nutritional Parameters in Neonatal Dairy Calves. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.11, p.5189–5198, 2007.

KAPRONEZAI, J. **Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2004.

KEHOE, S. I.; JAYARAO, B. M.; HEINRICHS, A. J. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on pennsylvania dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4108–4116, 2007.

KITCHEN, B. J. Review of the progresso f dairy scienci: bovine mastits: milk compositional changes and related diagnostic test. **Journal of Dairy Reserach**,v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

KNOWLES, T. G.; EDWARDS, J. E.; BAZELEY, K. J.; BROWN, S. N.; BUTTERWORTH, A.; WARRISS, R. D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, v. 147, n. 21, p. 593-598, 2000.

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

LARSON, B. K.; HEARY, H. K.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 665-671, 1980.

LAZZARI, A. M.; OLIVEIRA, M. V. S.; MORETI, B.; GUIMARÃES, G.; KRUG, F.; NOLETO, G.; MESQUITA, A. J.; NEVES, J. P. Aspectos clínicos e laboratoriais da mastite induzida por inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* em vacas e búfalas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 5, p. 1299-1307, 2014.

LEJAN, C. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4-5, p. 403-417, 1996.

LENNETTE, E. H. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2011.

LOPES, F. P. N. **Caracterização física, composição e contagem de células somáticas de colostro de búfalas no Rio Grande do Sul**. 2011. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC de Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MADUREIRA, K. M. **Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , e INF- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva**. 2011. 106 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAUNSELL, F. P.; MORIN, D. E.; CONSTABLE, P. D.; HURLEY, W. L.; McCOY, G. C.; KAKOMA, I.; ISAACSON, R. E. Effects of Mastitis on the volume and composition of colostrums produced by Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81 p. 1291-1299. 1998.

McCLURE, J. J. The immune system. *In*: McKINNON, A. O.; VOSS, L. J. (ed) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p. 1003-1016.

MEE, J. F. Prevalence and risk factors for distocia in dairy cattle: a review. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 93-101, 2008.

MEDEIROS, E. S.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBA, R. B.; AZEVEDO, S. S.; JUNIOR, J. W. P.; SAUKAS, T. N.; ALBUQUERQUE, P. P.; MOTA, R. A. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 3, p. 219-223. 2011.

MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SAUKAS, T. N.; KREWER, C. C.; SANTOS, A.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Bubaline mastites

etiology in Northeast of Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, p. 1891-1894. 2013.

MEIJERING, A. Dystocia and stillbirth in cattle – A review of causes, relations and implications. **Livestock Production Science**, v. 11, p. 143-177, 1984.

MORONI, P. C.; ROSSI, C. S.; PISONI, G.; BRONZO, V.; CASTIGLIONI, B.; BOETTCHER, P. J. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **J Dairy Sci**, v. 89, p. 998-1003, 2006.

NAKAJIMA, Y.; MIKAMI, O.; YOSHIOKA, M.; MOTOI, Y.; ITO, T.; ISHIKAWA, Y.; FUSE, M.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K. Elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. **Res. Vet. Sci.**, v. 62, p. 297–298, 1997.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory handbook on bovine mastitis. Arlington: The National Mastitis Council-NCM, 1999.

NEAVE, F. K.; DODD, F.H.; HERINQUES, E. Udder infections in the 'dry period'. **J. Dairy Res.**, v. 17, p. 37. 1950.

NIX, J. M.; SPITZER, J. C.; GRIMES, L. W.; BURNS, G. L.; PLYLER, B. B. A retrospective analysis of factors contributing to calf mortality and dystocia in beef cattle. **Theriogenology**, v. 49, p. 1515-1523, 1998.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 675–678, 2001.

OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. Udder health in the periparturient Period. **J. Dairy Sci.**, v. 71, p. 2584-2606, 1988.

OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambientes sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa no Paraná.** 1999. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PATHAK, N. N. **Behaviour and training of river buffaloes.** *In*: TULLOH, N. M.; HOLMES, J. H.G. Buffalo production. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 223-232. (World Animal Science, C6).

PELERRIN, J. L. L'immunité neo-natale des bovins. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 133, n. 8-9, p. 521-537, 1982.

PIZAURO, L.; SILVA, D.; SANTANA, A.; CLEMENTE, V.; LARA, G.; VAZ, A.; VIDAL-MARTINS, A.; RIBEIRO, M.; FAGLIARI, J. Prevalence and etiology of buffalo mastites and milk somatic cell count in dry and rain seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, p. 1703-1710, 2014.

PRASAD, R. V.; RATHANAM, K.; SHAH, D. G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira District, India. **Indian J Dairy Sci**, v.49, p.441-447, 1996.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAJARAMAN, V.; NONNECKE, B.J.; HORST, R.L. Effects of replacement of native fat in colostrum and milk with coconut oil on fat-soluble vitamins in serum and immune function in calves. **J Dairy Sci.**, v. 80, p. 2380–2390, 1997.

RIOLLET, C.; PASCAL, R.; POUTREL, B. Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with

Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 2, p. 161-167, 2000

RANGEN, S. A.; SURUJBALLI, O. P.; LUTZE-WALLACE, C.; LEES, V. W. Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 270-274, 2009.

ROCHA, T. G. **Avaliação da transferencia de imunidade passiva em bezerros da vacas da raça Cachim**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de ciências agárias e veterinárias de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2010.

SANCHEZ, L.; LUJAN, L.; ORIA, R.; CASTILLO, H.; PEREZ, D.; MANUELENA, J.; CALVO, H. Synthesis of Lactoferrin and Transport of Transferrin in the Lactating Mammary Gland of Sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1257-1262, 1992.

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade**. 2004. 161 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SANTOS, G. G. F. **Avaliação colostrar e de níveis séricos imunes de bezerros holandeses oriundos de vacas acometidas ou não por mastite**, 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' – Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba, Araçatuba, 2013.

SAWYER L. Beta-lactoglobulin, p.319-386. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY P. L. H. (Ed), **Advanced Dairy Chemistry**. Vol.1. Protein. Kluwer Academic, Cork. Schalm. 2003.

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

SCHULZ, V. J.; BECK, K.; DJIRE, M. Effect of mastitis on bovine colostrum. **Monatshefte fur Veterinarmedizin**, v. 40. p. 256–259, 1985.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in búfalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo J.**, v. 10, p. 133-137, 1994.

SILVA, N. S.; SILVEIRA, J. A. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; MENDONÇA, C. L.; ALBERNAZ, T. T.; GUARANÁ, E. L. S.; LIMA, D. H. S.; BARBOSA, J. D. Ocorrência de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas em sistema extensivo no estado do Pará, **Brasil. Biosci. J.**, v. 30, suplemento 2, p. 839-846. 2014.

SINGH, N.; SHARMA, V. K.; RAJANI, H. B.; SINHA, Y. R. Incidence, economy and test efficacy of subclinical mastitis in dairy animals. **Indian Vet J**, v. 59, p. 693-696, 1982.

SINGH, A.; AHUJA, S. P. Individual variation in the composition of colostrums and absorption of colostrum antibodies by the pre-colostral buffalo calf. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 1148-1156, 1993.

SMITH, K.L.; TOADHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P.S. Environment Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 1531-1553, 1985.

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987. p. 399.

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

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K., DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851–1865, 1997

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C.; AKERS, R. M. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 228–240, 1989.

TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido. *In*: TIZARD, I. R, **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 233-246

VELS, L.; RONTVED, C. M.; BJERRING, M.; INGVARTSEN, K. L. Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 92. p. 922–934, 2009

VORSTER, J. H., LUGT, J. J. V. D., HENTEN, M. M., BASTIANELLO, S. S., VANDER-LUGT, J. J. *Escherichia Coli* strain as the cause of the diarrhea in calves in S. Africa. **J. of S. Africa, Vet. Ass.**, v. 65. p. 1-3, 1994.

WENZ, J. R.; FOX, L. K.; MULLER, F. J.; RINALDI, M.; ZENG, R.; BANNERMAN, D. D. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis **J. Dairy Sci.**, v. 93. p. 2458–2470, 2010.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 6, p. 461-468, 2003a.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrums-fed newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 7, p. 813-816, 2003b.

YAMANAKA, H.; KATAGIRI, Y.; DOMI, M.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Effect of Interleukin-1 receptor antagonist on Concanavalin A response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 8, p. 933-935, 2001.