UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA DE OVELHAS NO PERÍODO SECO COM ANTIMICROBIANO CONVENCIONAL E ANTIMICROBIANO NANOPARTICULADO

Raul Costa Mascarenhas Santana

Médico Veterinário

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA DE OVELHAS NO PERÍODO SECO COM ANTIMICROBIANO CONVENCIONAL E ANTIMICROBIANO NANOPARTICULADO

Raul Costa Mascarenhas Santana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2014

Santana, Raul Costa Mascarenhas
S232t Tratamento da mastite subclínica de ovelhas no período seco com antimicrobiano convencional e antimicrobiano nanoparticulado / Raul Costa Mascarenhas Santana. – – Jaboticabal, 2014
vii, 77 p. ; il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Luiz Francisco Zafalon
Banca examinadora: Márcio Garcia Ribeiro, José Jurandir Fagliari
Bibliografia

1. Cloxacilina. 2. Mastite subclínica. 3. Nanocápsulas. 4. Ovelhas. 5. Secagem. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.19-002:636.3

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

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA DE OVELHAS NO PERÍODO SECO COM ANTIMICROBIANO CONVENCIONAL E ANTIMICROBIANO NANOPARTICULADO

AUTOR: RAUL COSTA MASCARENHAS SANTANA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MÁRCIO GARCIA RIBEIRO
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública / Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de Botucatu

Data da realização: 19 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAUL COSTA MASCARENHAS SANTANA – nascido em Salvador-Ba, em 17 de novembro de 1983. Iniciou sua trajetória acadêmica cursando Medicina Veterinária na Universidade Federal da Bahia (UFBA) no ano de 2002. Durante a graduação foi contemplado com três bolsas de iniciação científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e aprovado em 2006 no concurso para o cargo de Analista Médico Veterinário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o qual assumiria após o término da graduação no ano de 2007. Cursou a especialização em Sanidade de Animais de Produção entre 2008 e 2010 ofertada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP – Câmpus de Botucatu). Em 2008 tornou-se professor do Centro Paulista de Estudos Agropecuários, localizado em São Carlos-SP. No ano de 2010 ingressou na segunda graduação, agora cursando Pedagogia na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e em 2012 iniciou o programa de mestrado em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) na UNESP (Câmpus de Jaboticabal).

EPÍGRAFE

(...) “Eu devia estar contente
Por ter conseguido
Tudo o que eu quis
Mas confesso abestalhado
Que eu estou decepcionado
Porque foi tão fácil conseguir
E agora eu me pergunto ‘E daí?’
Eu tenho uma porção
De coisas grandes pra conquistar
E eu não posso ficar aí parado” (...)

(Raul Seixas)

DEDICATÓRIA

Diante de todas as dificuldades que passamos juntos os desafios superados e os sonhos que compartilhamos, todo o esforço empregado neste trabalho não poderia ser dedicado a outra pessoa que não fosse a Tárcila Mascarenhas, minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por trilhar meus caminhos e ajudar em minhas escolhas;

À minha esposa Tárcila Mascarenhas, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus pais Maria José Costa Mascarenhas Santana e Roberto Ferreira Santana, por me ensinarem os princípios éticos e despertar em mim a paixão pelos animais e pela Medicina Veterinária;

À minha irmã Michelle Costa Mascarenhas Santana, por acreditar no meu potencial;

Ao meu orientador Luiz Francisco Zafalon, por dedicar seu tempo para minha formação profissional e pessoal;

Aos professores Luís Antônio Mathias, Antônio Nader Filho, Antônio Sergio Ferraldo, Jane Megid e Márcio Garcia Ribeiro, por serem exemplos a serem seguidos;

Aos pesquisadores e amigos Humberto de Mello Brandão, Sérgio Novita Esteves, Silvia Helena Govoni Brondi, Dalva Aparecida Souza, José Manoel Marconcini, Waldomiro Barioni Júnior, Eny Maria Vieira, Rafael Rosendo, Avelardo Ferreira, Maria José Galdino, José Pereira Gonçalves, José Cosme Machado, Lucas Eduardo Pilon, Eliane Valle Tanaka, Fernanda Manieli, Maria Rosa da Silva Silvério, Guilherme Aparecido Junior, Rodrigo Giglioti e Márcio Dias Rabelo por me ajudarem no desenvolvimento deste trabalho;

À Fapesp, pelo auxílio financeiro (processo nº 2012/03847-1).

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Página

DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS..... iii
RESUMO..... iv
ABSTRACT..... v
LISTA DE FIGURAS..... vi
LISTA DE TABELAS..... vii
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OJETIVOS..... 3
3. REVISÃO DE LITERATURA..... 4
3.1. O Aparelho Mamário Ovino..... 4
3.2. Mastite em Ovelhas..... 7
3.3. Agentes Etiológicos da Mastite Ovina..... 10
3.4. Métodos Diagnósticos da Mastite Subclínica Ovina..... 15
3.5. Tratamento da Ovelha Seca..... 19
3.6. Terapia Antimicrobiana Convencional da Mastite Ovina..... 22
3.7. A Nanotecnologia na Terapia de Infecções..... 26
3.8. Análise de Resíduos no Leite..... 30
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 33
4.1. Local, Período e Animais Experimentais..... 33
4.2. Coletas das Amostras de Leite..... 34
4.3. Realização do CMT e da Contagem de Células Somáticas..... 34
4.4. Diagnóstico Microbiológico..... 35
4.5. Determinação da Sensibilidade aos Antimicrobianos..... 37
4.6. Determinação da Mastite Subclínica por Micro-organismos..... 37
4.7. Tratamentos Experimentais..... 37
4.7.1. Grupos Experimentais..... 37
4.7.2. Elaboração dos Antimicrobianos..... 39
4.7.2.1. Antimicrobiano Nanoencapsulado..... 39
4.7.2.2. Antimicrobiano Convencional (Forma Livre)..... 40
4.7.3. Administração de Antimicrobianos via Intramamária..... 40

4.8. Determinação da Cura Microbiológica..... 41
4.9. Identificação de Resíduos de Cloxacilina no Colostro Ovino..... 41
4.10. Análise Estatística..... 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 44
6. CONCLUSÕES..... 61
7. REFERÊNCIAS 62

Embrapa

Pecuária Sudeste

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado: "Tratamento da mastite subclínica de ovelhas no período seco com antimicrobianos convencional e nanoparticulado", utilizando 76 animais da espécie ovina (*Ovis aries*), sob responsabilidade do pesquisador científico Dr. Luiz Francisco Zafalon, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: "Treatment of subclinical mastitis in sheep during the dry period with conventional and nanoparticle antimicrobials", utilizing 76 animals of the ovine (*Ovis aries*) species, under the responsibility of the scientific researcher Dr. Luiz Francisco Zafalon, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 15 de Junho de 2012.

Dr. Rui Machado
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-56100 - Fax (16) 3361-5754
e-mail: sac@cppse.embrapa.br

TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA DE OVELHAS NO PERÍODO SECO COM ANTIMICROBIANO CONVENCIONAL E ANTIMICROBIANO NANOPARTICULADO

RESUMO - Este estudo teve como objetivos: investigar os micro-organismos causais da mastite subclínica em ovelhas de aptidão para produção de carne, definir pontos de corte de dois métodos de diagnóstico indiretos, comparar as taxas de cura do tratamento da mastite subclínica após infusão intramamária de princípio ativo antimicrobiano no momento da secagem em duas diferentes formulações, convencional e nanoparticulada, verificar as taxas de cura espontânea, avaliar a capacidade de prevenção da ocorrência de novas infecções mamárias e verificar a presença de resíduos antimicrobianos no leite de ovelhas submetidas ao tratamento à secagem, na lactação consecutiva. O estudo foi realizado em um rebanho localizado em uma propriedade no município de São Carlos, São Paulo. Analisou-se um total de 393 mamas de ovelhas de aptidão para produção de carne, 250 das quais pertencentes a 130 ovelhas da raça Santa Inês e outras 143 mamas de 77 ovelhas da raça Morada Nova. Amostras de leite foram coletadas e submetidas ao exame de *California Mastitis Test* (CMT), à contagem de células somáticas (CCS) e ao exame microbiológico antes da secagem e após o parto subsequente. As glândulas mamárias com mastite subclínica foram distribuídas nos seguintes grupos: G1 (Controle; glândulas mamárias que não receberam tratamento antimicrobiano); G2 (glândulas mamárias em que foi administrado 100 mg de cloxacilina benzatina/ 10 mL em estrutura convencional) e G3 (glândulas mamárias em que foi administrado 50 mg de cloxacilina benzatina/ 86 mL em estrutura nanoencapsulada). Para avaliação dos tratamentos quanto à capacidade de prevenir novas infecções, foram utilizadas as mamas saudáveis dos animais dos grupos experimentais G1, G2 e G3, e foi acrescido o grupo G4 (glândulas mamárias saudáveis em que foi administrado 100 mg de cloxacilina benzatina/ 172 mL em estrutura nanoencapsulada). A ocorrência de animais positivos para mastite infecciosa na raça Santa Inês foi de 33,1% e de 35,6% nas ovelhas da raça Morada Nova. *Staphylococcus* coagulase-negativos foram os agentes etiológicos predominantes (50,6% dos casos). Os exames de *California Mastitis Test* e da contagem de células somáticas podem ser usados para nortear o tratamento na secagem de ovelhas utilizando os pontos de cortes de 1+ ou de 388 x 10^3 células/ mL de leite, respectivamente. O tratamento aplicado ao G3 mostrou-se mais eficiente (P = 0,0429) na cura de mamas com mastite subclínica no momento da secagem. O uso da cloxacilina no momento da secagem de ovelhas de corte no rebanho com ocorrência de mastites subclínicas observada neste estudo é um método eficiente para redução dessas infecções após o parto, quando administrados em estrutura nanoencapsulada e na concentração de 50 mg/ 86 mL. A taxa de cura espontânea foi de 19%. Não houve diferenças entre os grupos quanto à capacidade de prevenir novas infecções em mamas saudáveis. A cloxacilina não foi detectada por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos em concentrações a partir do limite de quantificação de 1 mg/ L no colostro das ovelhas.

Palavras-chave: cloxacilina, mastite subclínica, nanocápsulas, ovelha, secagem

TREATMENT OF SUBCLINICAL MASTITIS IN SHEEP DURING THE DRYING OFF PERIOD WITH CONVENTIONAL ANTIMICROBIAL AND NANOPARTICLE ANTIMICROBIAL

ABSTRACT - This study had as objectives: investigate the microorganisms that cause subclinical mastitis in meat producing sheep, define cut-off values of two methods of indirect diagnosis, compare cure rates of treatment of subclinical mastitis after intramammary infusion of antimicrobial active principle at the time of drying off in two different formulations, conventional and nanoparticle, check the rates of spontaneous cure, evaluate the capability of prevention of new infections and check the presence of antimicrobial residues in milk of sheep subjected to treatment during drying off, on consecutive lactation. The study was done in a flock located on a property in São Carlos city, São Paulo. We analyzed a total of 393 mammary glands of meat producing sheep, 250 of which belong to 130 Santa Inês breed sheep and other 143 mammary glands of 77 Morada Nova breed sheep. Milk samples were collected and submitted to California Mastitis Test (CMT), the somatic cell count (SCC) and microbiological exam before drying off and after subsequent parturition. The mammary glands with subclinical mastitis were as follows: G1 (Control, mammary glands that not received antibiotic treatment), G2 (mammary glands which was administered 100 mg of benzathine cloxacillin/ 10 mL in conventional structure) and G3 (mammary glands which was administered 50 mg benzathine cloxacillin/ 86 mL in nanocoated structure). For evaluation of treatments about their capability to prevent new infections, we used the mammary glands of healthy animals of experimentals groups groups G1, G2 and G3, and G4 was added group (healthy mammary glands, which was administered 100 mg of benzathine cloxacillin/ 172 mL in nanocoated structure). The occurrences of animals positive for infectious mastitis in Santa Ines breed sheep was 33.1% and 35.6% in Morada Nova breed sheep. Coagulase-negative *Staphylococci* were the predominant etiologic agents (50.6% of cases). The exams of California Mastitis Test and somatic cell count can be used to guide the treatment in the drying off sheep using cut-off values of 1 + or 388 x 10^3 cells / mL of milk, respectively. The treatment applied to the G3 was more efficient (P = 0.0429) in curing mammary glands with subclinical mastitis at the time of drying off. The use of cloxacillin at the moment at drying off of meat producing sheep in the flock to the occurrence of subclinical mastitis observed in this study is an effective method for reducing these infections after parturition when administered in structure nanocoated and in concentration of 50 mg/ 86 mL. The spontaneous cure rate was 19%. There were not differences between the groups in their capability to prevent new infections in healthy mammary glands. The cloxacillin was not detected by high-performance liquid chromatographic method with diode-array detection at concentrations from the limit of quantification of 1 mg/ L in colostrum of sheep.

Keywords: cloxacillin, drying off, nanocapsules, sheep, subclinical mastitis

LISTA DE FIGURAS

Figuras **Página**

1 - Colônias cinzas e amarelas sugestivas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue ovino a 5%..... 35
2 - Colônias cinzas pequenas sugestivas de *Streptococcus* spp. em ágar sangue ovino a 5%..... 35
3 - Cocos Gram-positivos em formato de cacho de uvas visualizados na coloração de Gram (aumento de 1000 vezes)..... 36
4 - Prova da catalase ilustrando resultados positivos ao teste..... 36
5 - Prova da coagulase lenta com uma amostra positiva, controles positivos e negativos (sequenciados de cima para baixo)..... 36
6 - Curva TG-ROC (*Two-graph receiver operating característic*) da relação dos exames de CCS e Microbiológico..... 48
7 - Mama de ovelha da raça Santa Inês com mastite clínica na parição pós-tratamento..... 54
8 - Mama de ovelha da raça Morada Nova com mastite clínica na parição pós-tratamento..... 54
9 - Úbere ovino 24 horas após infusão intramamária de antimicrobiano nanoencapsulado..... 59
10 - Cromatograma do extrato da amostra nº20 registrando a ausência de resíduo de cloxacilina..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabelas **Página**

1 - Ocorrência de agentes etiológicos em infecções mamárias puras ou mistas em ovelhas de aptidão para produção de carne..... 44

2 - Características dos pontos de cortes dos métodos diagnósticos da mastite subclínica de ovelhas de corte utilizados na secagem..... 46

3 - Índices de concordâncias (Kappa – k) entre pontos de corte de CMT e de CCS..... 49

4 - Contagens de células somáticas (células/ mL de leite x 10^3) antes da secagem das mamas nos diferentes grupos experimentais..... 50

5 - Distribuição das glândulas mamárias com mastite subclínica nos grupos experimentais de acordo com os micro-organismos isolados..... 51

6 - Taxas de cura* obtidas para mamas de ovelhas nos grupos testados..... 51

7 - Evolução da mastite subclínica em mamas saudáveis após serem submetidas aos tratamentos experimentais..... 55

8 - Evolução do número de células somáticas das mamas infectadas quando comparadas as duas lactações, antes da secagem e após a parição, de acordo com o grupo experimental..... 56

9 - Médias de CCS relacionadas aos micro-organismos isolados em mamas ovinas..... 57

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura apresentou-se nos últimos anos como alternativa relevante para a atividade pecuária, ocupando posição de destaque no cenário nacional, com rebanho efetivo superior a 17 milhões de animais. Entre as regiões brasileiras, a Sudeste destaca-se com o maior índice de expansão do rebanho (56,3%) no período de 2003 a 2011, possuindo efetivo de 771.190 animais, dos quais 58,6% estão no Estado de São Paulo (ANUALPEC, 2013). Esta atividade também se apresenta como fator importante para fixação do homem no campo e sobrevivência de pequenas propriedades (OLIVEIRA, 1996). Apesar do crescimento da produção de carne ovina na última década, o Brasil ainda permanece como país importador, principalmente do Uruguai (MEDEIROS et al., 2011).

Entre os problemas sanitários que mais afetam a saúde de ovelhas de corte e são responsáveis pelo descarte prematuro da matriz, destaca-se a mastite, processo inflamatório da glândula mamária, geralmente causada por infecções bacterianas. A mastite apresenta-se na forma clínica ou subclínica a depender da gravidade da inflamação.

As alterações provocadas no tecido mamário pela mastite em ovelhas refletem-se não somente na redução da produção de leite mas também no conteúdo celular e nas características físico-químicas, comprometendo a qualidade nutricional para a alimentação dos borregos (SANTOS et al., 2007b). O desempenho de cordeiros de corte na fase de amamentação é afetado em ovelhas com a mama comprometida pelo processo inflamatório, o que implica menor peso à desmama e pode influenciar a fase de recria e terminação. A redução da oferta de proteína animal não somente afeta a economia como representa um problema de saúde pública, principalmente em populações carentes do semiárido brasileiro. Em ovelhas de aptidão para produção de carne, como das raças Santa Inês e Morada Nova, nas quais é comum a ocorrência de partos gemelares, a afecção da glândula mamária pode representar a redução do tempo de vida útil.

Os patógenos envolvidos possuem fatores de virulência que facilitam a colonização e infecção da glândula mamária. Podem evadir-se das defesas do

hospedeiro ao se aderirem às células epiteliais, produzindo cápsula que dificulta a fagocitose e destruição pelos neutrófilos, produzem leucotoxinas ou podem se manter no interior das células do hospedeiro para escapar da resposta imune (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

O procedimento de secagem da ovelha faz parte da gestão da saúde da glândula mamária. No entanto existe uma carência de estudos sobre o uso de tratamentos antimicrobianos nesta espécie durante o período seco, sobretudo em raças de corte. A formulação do antibiótico, a concentração ideal e a forma de administração do fármaco adaptadas às ovelhas, capazes de prevenir o desenvolvimento da mastite infecciosa e curar a infecção subclínica durante a fase da secagem, encontram-se indefinidas.

Maiores informações referentes ao uso de produtos antimicrobianos contra a doença na espécie ovina deveriam estar disponíveis para colaborar com técnicos e produtores nas tomadas de decisão, o que possibilitará a adoção de esquemas de tratamento e profilaxia adequados e a redução dos prejuízos decorrentes da doença.

As formulações antimicrobianas tradicionais apresentam pouca chance de penetração em altas concentrações nos neutrófilos infectados, não eliminando focos de infecção intracelular, o que favorece recidivas pós-tratamentos. Uma melhor eficácia da terapia requer o uso de antibióticos capazes de entrar nos fagócitos e inativar os micro-organimos intracelulares, caracterizados por infecções recorrentes.

As nanopartículas são estruturas em tamanho semelhante ao de moléculas biológicas capazes de proporcionar melhorias da biodisponibilidade do fármaco, modificação dos perfis farmacocinéticos e a especificidade da ação e da penetração intracelular para diferentes fármacos macromoleculares (IRACHE et al., 2011). Sistemas particulados têm sido propostos para a entrega de agentes antimicrobianos no ambiente intracelular, contribuindo assim para aumentar o índice terapêutico de antimicrobianos nos locais das infecções (LECÁROZ et al., 2006). Diante do exposto e devido à ausência de esquemas de tratamento específicos para o controle da mastite ovina, este trabalho propôs os objetivos a seguir:

2. OJETIVOS

- Investigar os micro-organismos causais da mastite subclínica em ovelhas de corte;

- Definir pontos de corte de dois métodos de diagnóstico indiretos da mastite subclínica para avaliação da saúde da glândula mamária de ovelhas com aptidão para produção de carne;

- Comparar as taxas de cura do tratamento da mastite subclínica após infusão intramamária de princípio ativo antimicrobiano no momento da secagem de ovelhas em duas diferentes formulações (convencional e nanoparticulada);

- Verificar as taxas de cura espontânea da mastite subclínica infecciosa ovina;

- Avaliar a capacidade de prevenção da ocorrência de novas infecções mamárias quando administradas diferentes formulações de antimicrobianos no momento da secagem;

- Determinar se há resíduos antimicrobianos no leite de ovelhas submetidas ao tratamento à secagem, na lactação consecutiva.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O Aparelho Mamário Ovino

As particularidades da glândula mamária da ovelha, principalmente as de aptidão para produção de carne ainda não estão totalmente elucidadas (GUARANÁ et al., 2011). A glândula mamária ovina possui dimensões inferiores às da bovina, com pesos que variam de 0,9 Kg a 2,24 Kg (RATTRAY et al., 1974; ANDERSON, 1975; SWANSON et al., 2008).

A manutenção dos tetos saudáveis contribui para a prevenção da mastite ovina por reduzir o risco de contaminações e limitar a colonização do local por micro-organismos oriundos da própria pele e do ambiente (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009). Lesões traumáticas nos tetos também estão associadas com menores pesos dos cordeiros, provavelmente porque a ovelha pode limitar a mamada devido ao desconforto (HUNTLEY et al., 2012). Úberes de ovelhas com má conformação (pendulares ou apresentando tetos muito laterais ou muito mediais) favorecem a redução da mamada pelo cordeiro, estão mais expostos à contaminação do ambiente e estão associados com alta contagem de células somáticas (CCS) (HUNTLEY et al., 2012).

O esfíncter do teto ovino é a primeira barreira de proteção da glândula mamária. Por ser muito estreito, a introdução de estruturas com grandes dimensões pode danificá-los (MAVROGIANNI et al., 2006). O epitélio do canal do teto é a fronteira entre a glândula mamária e o ambiente exterior. As respostas celulares locais são de importância para a defesa da glândula mamária (MAVROGIANNI et al., 2007a). A sucção do leite pelo cordeiro pode levar micro-organismos presentes na sua naso-faringe de forma ascendente à glândula mamária, a exemplo de *Mannheimia haemolytica*. No entanto, a deposição de organismos patogênicos no canal do teto de ovelhas clinicamente saudáveis nem sempre resultará em mastite devido às defesas intrínsecas presentes (FRAGKOU et al., 2011). Em casos de tetos danificados, invasão bacteriana resulta, invariavelmente, em mastite (MAVROGIANNI et al., 2006) devido ao constante desafio provocado pelo aumento da colonização

bacteriana na pele dos tetos e ao esgotamento das defesas locais (FRAGKOU et al., 2011).

À semelhança das vacas, o canal do teto das ovelhas é composto de epitélio escamoso estratificado que se transforma em dois conjuntos de células epiteliais cuboides na junção com a cisterna do teto, formando a Roseta de Fürstenberg (KIOSSIS et al., 2009). Os nódulos linfáticos presentes entre o canal do teto e a cisterna desempenham um papel de defesa importante contra micro-organismos invasores (FRAGKOU et al., 2011). A presença de nódulos linfáticos aumentados pode ser um indicador de maior capacidade de resposta imune efetiva contra patógenos, mas também pode indicar a exposição contínua a potenciais organismos invasores neste local (MAVROGIANNI et al., 2007a).

A infecção mamária induz ao aumento da permeabilidade do endotélio para a passagem de componentes do sangue para o leite (ALBENZIO et al., 2012). Os neutrófilos migram do sangue através das paredes dos vasos para a glândula mamária devido a mediadores, principalmente às citocinas. No local da infecção, os neutrófilos fagocitam e destroem bactérias invasoras. Esta destruição é realizada por dois processos: a “explosão respiratória”, quando o neutrófilo ativado produz radicais oxidativos após aumentarem em 100 vezes seu consumo de oxigênio; e por liberação de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos dos grânulos intracelulares (TIZARD, 2009). Os neutrófilos são as primeiras células da resposta imune do hospedeiro contra os patógenos, devido ao seu recrutamento rápido e à capacidade de liberar vários componentes antibacterianos (ALBENZIO et al., 2012).

O epitélio da mucosa da cisterna do teto é mais vulnerável às toxinas bacterianas, bem como às lesões, em comparação com o epitélio estratificado do canal do teto. Uma reação inflamatória grave no epitélio do canal e da cisterna do teto caracteriza-se por intenso afluxo de linfócitos e plasmócitos, presença de estruturas linfoides, presença de saliências da mucosa do lúmen da cisterna do teto formando pequenos diafragmas simples ou múltiplos, espessamento da roseta de Fürstenberg e proliferação de tecido fibroide na cisterna do teto, o que pode acarretar obstrução total e impossibilitar o acesso via intramamária (KIOSSIS et al., 2009). Na glândula mamária, o número e a

distribuição dos leucócitos são importantes para o sucesso da proteção contra a invasão de organismos patogênicos. Linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares desempenham papel importante nas respostas inflamatórias dentro da glândula mamária ovina (ALBENZIO et al., 2012).

A glândula mamária lactante é composta de uma rede de ductos revestidos por células epiteliais e que termina em alvéolos que estão rodeados por uma camada única de células epiteliais secretoras. As células mioepiteliais e um estroma de tecido conjuntivo vascularizado contendo lipídios com depleção de adipócitos e fibroblastos cercam os alvéolos. Os complexos juncionais apicais ligam as células epiteliais de revestimento e inibem a troca direta de substâncias entre o compartimento vascular e do leite durante a lactação (GEHRING; SMITH, 2006).

No momento da secagem, a estagnação do leite na glândula provoca aumento de pressão e consequente dilatação do canal do teto. A retenção do leite determina o desenvolvimento de um processo inflamatório, enquanto o orifício do teto aberto permite a penetração de micro-organismos. Esse mecanismo explica a maior suscetibilidade à mastite observada no período de involução da mama (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

A involução da mama leva a alterações fisiológicas que ocasionam mudanças significativas na secreção mamária, muito semelhante àquelas observadas durante a mastite, como aumento do potencial hidrogeniônico (pH), do teor de proteínas e da CCS e redução do teor de lactose (BLAGITZ et al., 2010). Durante a involução mamária, numerosos leucócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos, infiltram-se nas secreções dentro do lúmen dos alvéolos e ductos. Existem duas ondas de migração de células fagocitárias na glândula mamária: a primeira envolvendo o recrutamento dos neutrófilos ao longo dos primeiros dois dias após o desmame, e na segunda ocorre a migração de macrófagos, os quais removem os neutrófilos apoptóticos, que representa importante mecanismo de eliminação dos neutrófilos limitando a toxicidade potencial desta migração leucocitária. A maioria dos linfócitos residentes nos tecidos glandulares são do tipo $CD8^+$ (TATARCZUCH et al., 2000; 2002).

3.2. Mastite em Ovelhas

Diversos problemas sanitários são impactantes na criação de ovinos. A mastite é considerada limitante para a exploração da atividade diante dos prejuízos econômicos que acarreta (SANTOS et al., 2007b). Mastite é o processo inflamatório da glândula mamária, geralmente causada por bactérias. Quanto à manifestação dos sinais, pode ser classificada em clínica ou subclínica. A síndrome clínica pode seguir um curso variável de hiperaguda a crônica, de acordo com a gravidade da inflamação e o comprometimento sistêmico, enquanto na mastite subclínica os sinais não são visualmente detectáveis e só pode ser evidenciada por exames complementares (MAROGNA et al., 2010).

Na mastite clínica em ovelhas, o coeficiênte de letalidade pode alcançar 40%, na ausência de tratamento (SANTOS et al., 2007b). Na avaliação por inspeção e palpação da metade mamária afetada de forma clínica, as glândulas mostram-se aumentadas de volume ou atrofiadas, com endurecimento do tecido mamário e com a presença de nódulos de tamanhos variados. Pode haver ausência da secreção láctea ou, quando presente, pode apresentar grumos, pus e/ou sangue (SILVA et al., 2010). Sinais sistêmicos como: apatia, febre, congestão da mucosa ocular, taquicardia, taquipneia, anorexia, hipomotilidade ou atonia ruminal, ausência da ruminação, fezes diarreicas, claudicação ipsilateral à glândula inoculada, perda de peso e morte podem ser observados (SANTOS et al*.,* 2007b).

Em pequenos ruminantes, a incidência anual de episódios clínicos da mastite é estimada em menos de 5% em condições normais, enquanto em rebanhos endêmicos pode atingir incidência maior que 50% (MAROGNA et al., 2010). Waage e Vatn (2008) observaram que 40% dos casos das mastites clínicas ocorreram entre sete dias antes e sete dias depois do parto. Existe uma associação inversa entre a quantidade de cordeiros e a chance de desenvolvimento da mastite clínica e subclínica, de modo que a fim de reduzir o impacto da enfermidade pode ser vantajoso manter as ovelhas aleitando mais de um cordeiro, particularmente nas primeiras semanas de lactação (ARSENAULT et al., 2008).

Silva et al. (2010) observaram que a maioria das ovelhas com mastite possuía apenas um borrego ao pé e sugeriram que na amamentação de dois ou três cordeiros o consumo de leite aumenta, favorecendo o melhor esvaziamento das glândulas mamárias. Contraditoriamente, Waage e Vatn (2008) observaram que as chances de ocorrência da mastite clínica em ovelhas aumentam com o maior número de cordeiros amamentados, provavelmente devido à irritação nos tetos provocada pela mamada.

A mastite subclínica é caracterizada por alterações quantitativas e qualitativas do leite, principalmente pelo aumento do número de células somáticas (BERGONIER; BERTHELOT, 2003). Na forma subclínica não se observam alterações visíveis na secreção láctea e no úbere (SANTOS et al., 2007b). As infecções mamárias subclínicas causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) e outros patógenos têm sido associadas com aumento do número de células somáticas no leite de ovelhas (PENGOV, 2001). A presença dos *Staphylococcus* spp. causando mastite em ovelhas sugere que a contaminação ambiental é importante, e a manutenção de um ambiente higienizado, com especial atenção para a cama e a densidade populacional, poderia ajudar a reduzir a incidência da infecção (ALBENZIO et al., 2012).

A infecção subclínica reduz significativamente a produção de leite da metade mamária acometida. No entanto, quando apenas uma metade é infectada, a outra metade é capaz de compensar parcialmente produzindo mais leite (LEITNER et al., 2004). Ovelhas criadas em sistemas extensivos de pastagens também apresentam elevada ocorrência de mastites. Al-Majali e Jawabreh (2003) observaram incidência de 24,8% de mastites subclínicas em ovelhas. As matrizes com idades acima de dois anos e multíparas destacaram-se como mais susceptíveis a apresentarem a enfermidade. A prevalência de mastite subclínica aumenta com a idade da ovelha (BLAGITZ et al., 2008). Adicionalmente, Al-Majali e Jawabreh (2003) e Blagitz et al. (2012) não observaram diferenças de ocorrência de mastites subclínicas em relação ao estágio de lactação, mantendo-se constante em todo o período.

A infecção mamária é dependente de fatores extrínsecos, como o clima, o tipo de instalação e as condições de cama dos animais, e fatores intrínsecos, como a idade, o número de lactações, o período da lactação e a imunidade da

glândula mamária (MORONI; CUCCURU, 2001). A microbiota do canal do teto e da glândula mamária é importante para a patogenia da mastite ovina. No entanto, também proporciona uma proteção contra a invasão de bactérias no canal do teto (MAVROGIANNI et al., 2007b). Há uma associação da ocorrência de mastite clínica a partir de casos antecedentes de mastite subclínica, assim como ovelhas que apresentam histórico de mastite anterior possuem maiores chances de desenvolver mastite a partir do parto seguinte (WAAGE; VATN, 2008). No entanto, Kirk, Glenn e Maas (1996) observaram 30% de mastite subclínica em ovelhas, e 21% das mastites subclínicas evoluíram para curas espontâneas após o desmame. A cura espontânea pode ser estimulada por meio de vacinação (HADIMLI et al., 2005).

Entre os prejuízos decorrentes da mastite ovina, destacam-se os custos com tratamentos (BURRIEL, 1999), o abate prematuro e a desvalorização comercial das matrizes por danos irreversíveis ao aparelho mamário de animais com alta linhagem genética (WATSON; BUSWELL, 1984; BERGONIER; BERTHELOT, 2003), os óbitos por apresentações gangrenosas (SANTOS et al., 2007b) e a produção de leite reduzida e as alterações na composição (LEITNER et al., 2004).

Ainda, se observa desempenho reduzido dos cordeiros (VERÍSSIMO et al., 2010), gastos adicionais com mão de obra como honorários de assistência técnica especializada e deslocamento de funcionários para suprir a necessidade de aleitamento artificial dos cordeiros (LARSGARD; VAABENOE, 1993). Tais prejuízos impactam negativamente a rentabilidade do produtor e a oferta de produtos e subprodutos desta atividade para o consumidor.

Cordeiros de ovelhas com mastite sem acesso a suplementação sólida durante a lactação tendem a ter retardo do crescimento, principalmente nas primeiras semanas, idade em que são altamente dependentes do leite (MORONI et al., 2007). A morte dos cordeiros devido à inanição com consequente desnutrição ou a redução da concentração de imunoglobulinas colostrais tem estreita relação com a mastite da ovelha e também é fonte de prejuízos. Assim, medidas preventivas contra a doença podem reduzir o risco de morte dos filhotes (CHRISTLEY et al., 2003).

3.3. Agentes Etiológicos da Mastite Ovina

A mastite é uma importante doença em ovelhas em sistemas de produção de leite, lã e carne (OMALEKI et al., 2010). Nas ovelhas, as infecções intramamárias são de origem bacteriana ou causadas por micoplasmas ou lentivírus, sendo que as bactérias possuem o papel mais importante nesta enfermidade (BERGONIER; BERTHELOT, 2003). A mastite é resultante da falência de uma complexa relação entre três fatores: resistência do hospedeiro, agente etiológico e ambiente (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

A influência da fase da lactação mostra-se controversa, podendo-se verificar uma prevalência constante de mastite subclínica em todo o período da lactação (AL-MAJALI; JAWABREH, 2003), ou maior prevalência no terço médio da lactação, provavelmente relacionada ao pico da produção de leite das ovelhas, que ocorre da terceira à quarta semana de lactação (SILVA et al., 2010).

A aderência das bactérias às superfícies mucosas é fator importante para a patogenicidade microbiana. Nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, a capacidade de aderência é fundamental para a manutenção dos micro-organismos na glândula durante a ordenha ou a amamentação e consequente multiplicação. No entanto, a aderência não é capaz de determinar a gravidade da inflamação causada pela invasão de estafilococos à glândula mamária ovina. Outros determinantes de virulência também estão presentes (BURRIEL, 1999).

As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede resistente resultante de uma camada grossa de peptidoglicano, o qual é composto de uma cadeia de polissacarídeos com ligações cruzadas entre os transpeptídeos. Esta camada densa confere rigidez celular e mantém a alta pressão osmótica interna de cerca de 20 atm. Em bactérias Gram-negativas, essa camada é mais fina e a pressão osmótica interna é menor (PRESCOTT, 2003).

Staphylococcus spp. são os principais agentes causadores de mastite clínica e subclínica em ovelhas leiteiras e de corte (BERGONIER; BERTHELOT, 2003). São bactérias Gram-positivas, esféricas, com cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, com ou sem presença de cápsula, anaeróbicos

facultativos e produzem a enzima catalase, que permite degradar o peróxido de hidrogênio em gás carbônico e água. Existem cerca de 20 espécies, das quais cinco de importância veterinária: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subespécie *coagulans* (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003b).

A proteína “coagulase” secretada por algumas espécies está presente em *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subespécie *coagulans*. Esta proteína reage com o fibrinogênio e produz uma reação semelhante à aglutinação, o que provoca coagulação do plasma *in vitro*. Toxinas hemolíticas podem ser produzidas. A toxina alfa atua sobre lipídios de membrana e é hemolítica *in vitro*. A toxina beta produz amplo halo de lise em ágar sangue bovino e ovino após incubação a 37ºC. A toxina delta lisa as células de diversos animais. Em meio de cultura, *Staphylococcus* spp. são isolados em 12 horas e produzem colônias opacas, lisas ou rugosas e com mais de 1 mm de diâmetro (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003b).

Na mastite clínica de ovelhas de corte, há predominância de *Staphylococcus* spp., especialmente *S. aureus*, comumente responsável por mastite superaguda. Ocorre também alta prevalência de SCN causando mastites agudas ou crônicas, e menor frequência de *Streptococcus* spp., *M. haemolytica* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

Entre os micro-organismos mais encontrados em amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica, destacam-se *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (COUTINHO et al., 2006; DOMINGUES et al., 2006; MAROGNA et al., 2010). Os SCN são considerados os principais agentes causais de mastite subclínica em ovinos (BERGONIER; BERTHELOT, 2003), podendo ser patógenos secundários ou oportunistas presentes na microbiota da pele do teto dos animais (SILVA et al., 2010).

O isolamento de SCN de glândulas mamárias saudáveis de ovelhas, mesmo em condições sépticas de colheita, é possível nos casos em que estes micro-organismos estejam presentes infectando os canais dos tetos (AL-MAJALI; JAWABREH, 2003) ou como contaminantes (ARSENAULT et al., 2008). Em consequencia à diminuição natural da imunidade pré-parto da

ovelha, as bactérias presentes no canal do teto podem invadir a glândula mamária e desencadear a mastite (MAVROGIANNI et al., 2007b). Infecções subclínicas causadas por SCN e outros patógenos têm sido associadas ao aumento das células somáticas no leite de ovelhas (PENGOV, 2001).

Para a saúde pública, SCN ganharam bastante importância com relação às bacteremias hospitalares nos últimos anos. Estes micro-organismos deixaram de ser considerados contaminantes de pouca importância clínica e foram reconhecidos como importantes agentes etiológicos (AZEVEDO et al., 2007). O teste com disco de novobiocina é muito útil para diferenciação de *Staphylococcus* resistentes (provavelmente do grupo *Saprophyticus*, como *S. cohnii* e *S. xylosus*), os quais são raramente encontrados em amostras clínicas humanas, de outros SCN (FARIÑA et al., 2005).

S. aureus são responsáveis tanto pela mastite clínica aguda (mastite gangrenosa) como pela mastite subclínica em ovelhas e secretam diversas toxinas que contribuem para a patogenia da enfermidade (CONTRERAS et al., 2007). *S. aureus* encontram-se presentes na pele do teto e na mucosa vaginal de ovelhas e na mucosa nasal de cordeiros. Os cordeiros normalmente são colonizados logo após o nascimento com a mesma cepa oriunda das mães (MORK; KVITLE; JORGENSEN, 2012). Durante o período de amamentação, a transmissão intermamária ocorre principalmente pelo transporte bucal. O maior risco de propagação é constituído pelo cordeiro, o qual pode sugar uma mama infectada e outra saudável sucessivamente (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

Os neutrófilos são a principal defesa celular contra *S. aureus*. A sobrevivência destes micro-organismos no interior dos neutrófilos após a fagocitose e posterior lise da célula hospedeira é um componente importante da patogenia (KOBAYASHI et al., 2010). A capacidade de sobrevivência intracelular os torna resistentes ao tratamento com antimicrobianos (WHITE, 2007). *S. aureus* produzem diversos fatores de virulência, tais como as leucotoxinas, capazes de matar os leucócitos polimorfonucleares e os monócitos (CONTRERAS et al., 2007). No entanto, o desencadeamento da doença causada pelo micro-organismo depende do estado do sistema imunológico do portador (RIVAS et al., 2007).

O predomínio dos SCN e dos *S. aureus* em mastite clínica e subclínica sugere que pode existir uma ligação entre a mastite clínica e a subclínica causadas pelas mesmas bactérias devido a fatores de risco comuns (ARSENAULT et al., 2008).

Estreptococos são considerados o segundo grupo de micro-organismos em importância na etiologia da mastite infecciosa dos ruminantes, sendo precedidos pelo grupo dos *Staphylococcus*. O gênero *Streptococcus* inclui pelo menos 50 espécies, que por sua vez abrangem muitos patógenos para os humanos e animais domésticos (SANTOS et al., 2007a). Estas bactérias são patógenos ambientais, com algumas cepas capazes de causar em um rebanho grande problema com mastite crônica nos rebanhos (WHITE, 2007).

Estreptococos são cocos Gram-positivos que ocorrem aos pares e em cadeias. No entanto, às vezes se coram fracamente como Gram-positivos ou Gram-negativos. Variam desde células esféricas a bastonetes curtos com cerca de 1 µm de diâmetro. No cultivo microbiológico, as colônias formadas são lisas ou mucoides, e pode ser difícil diferenciar a hemólise alfa da beta. As cápsulas, quando presentes, compõem-se de polissacarídeos e são antifagocíticas. Várias proteínas de superfície são responsáveis por aderência de estreptococos à matriz extracelular e são fatores de virulência. *Streptococcus* spp. desencadeiam processos inflamatórios que podem variar de infecções subclínicas até supuração, formação de abscesso (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003c) e fibrosamento da glândula mamária (WHITE, 2007).

Streptococcus spp. são micro-organismos catalase-negativos colonizadores transitórios da pele e residentes de mucosas. Podem ser isolados como parte integrante da microbiota normal dos tratos respiratório, gastrointestinal e genital de várias espécies animais (SANTOS et al., 2007a).

M. *haemolytica* e *Citrobacter freundii* também podem estar presentes causando infecções subclínicas em ovelhas. No entanto, não apresentam relevância epidemiológica (OMALEKI et al., 2010; SILVA et al., 2010). Uma cepa idêntica de *M. haemolytica* foi isolada a partir do canal do teto de uma ovelha e das amígdalas de seu cordeiro (MAVROGIANNI et al., 2007b). Esta bactéria é comumente associada à doença clínica (BERGONIER et al., 2003).

Outros patógenos como os micro-organismos da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella* spp.), também chamados coliformes, podem produzir infecções intramamárias em ovelhas (DRESCHER et al., 2010). O isolamento de micro-organismos da família Enterobacteriaceae associada à mastite clínica é um achado comum (PEIXOTO et al., 2010a). Os membros dessa família são semelhantes quanto às características morfológicas e de coloração, não sendo diferenciados através de esfregaço (HIRSH, 2003).

As bactérias mais importantes que compõem a família Enterobacteriaceae são *E. coli* e *Klebsiella* spp. e são encontradas principalmente no ambiente contaminado com fezes (WHITE, 2007). Apresentam-se como bastonetes pleomórficos, não formadores de esporos, que medem 2 a 3 µm por 0,4 a 0,6 µm, capsulados e com parede celular Gram-negativa constituída por membranas separadas por glicopeptídeo. As enterobacteriáceas sobrevivem em ambientes úmidos e sombreados e, embora sejam sensíveis a uma larga variedade de antimicrobianos, adquirem resistência muito rapidamente por plasmídeos (HIRSH, 2003).

E. coli é classificada como patógeno oportunista de origem ambiental. Casos recorrentes de mastites podem ser devidos a episódios de reinfecções ou a infecção persistente, alternando manifestações subclínicas e clínicas. No entanto, tendo em vista a heterogeneidade de *E. coli* ambientais, os episódios repetidos de infecção são causados normalmente por diferentes estirpes.

De acordo com a CCS, SCN resistentes à novobiocina, *Micrococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. podem ser considerados “patógenos menores” ou secundários, uma vez que induzem menores quantidades de células somáticas do que as glândulas mamárias saudáveis (GONZALO et al., 2002).

As corinebactérias são bacilos Gram-positivos pequenos, pleomórficos, não-esporulados e imóveis, com paredes celulares contendo ácido mesodiaminopimélico, arabinogalactano e ácidos micólicos. A parede celular apresenta uma elevada quantidade de lipídios, o que torna as células hidrofóbicas e contribui para sobrevivência dentro de fagócitos e à leucotoxidade. No cultivo microbiológico, formam-se colônias pequenas, escurecidas e foscas após 48 horas (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003a). Leitner et

al. (2003) isolaram *Corynebacterium* spp. na maioria dos rebanhos de ovinos estudados, mas observaram que a influência sobre a CCS é apenas moderada. Essas bactérias podem infectar apenas o canal do teto e/ou permanecer no úbere por curto período de tempo.

Outras bactérias isoladas, como os gêneros *Nocardia*, *Bacillus* e *Enterobacter*, parecem ser menos frequentes na etiologia da mastite subclínica durante o período de lactação (ARSENAULT et al., 2008). Bactérias da família *Micrococcaceae* também são isoladas do leite de ovelhas (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

3.4. Métodos Diagnósticos da Mastite Subclínica Ovina

Existe carência de estudos que abordem o diagnóstico da mastite ovina, especialmente das raças de aptidão para a produção de carne (NUNES et al., 2008). Na forma subclínica, notam-se mudanças na produção e alterações na composição físico-química do leite (SANTOS et al., 2007b). Alguns componentes lácteos como células, íons e componentes orgânicos podem ser utilizados como ferramentas para a detecção do processo inflamatório (PYÖRÄLÄ, 2003).

O diagnóstico da inflamação da glândula mamária pode ser obtido por vários métodos, os quais fundamentam-se na identificação direta do agente etiológico mediante a demonstração da presença de micro-organismos no leite ou por exames indiretos, que se baseiam em vários critérios de evolução de intensidade da reação inflamatória (MOTA, 2008). Testes indiretos como *California Mastits Test* (CMT), CCS, pH, conteúdo de cloretos e lactose, e identificação direta de patógenos no leite (GREEN, 1984; KEISLER; ANDREW; MOFFAT, 1992; SPANU et al., 2011) são úteis para o diagnóstico da mastite subclínica e a seleção de animais destinados ao tratamento ou ao descarte. A principal vantagem do diagnóstico seria permitir a terapia da ovelha seca (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003).

O CMT é um método indireto para detecção da mastite subclínica. As reações formadas após a homogeneização da mistura de leite e reagente à base de detergente contendo um indicador de pH classificam a mama de

acordo com a intensidade da reação formada. Reações menos intensas nesse método podem ser recomendadas para a classificação de animais com mastite, já que apresenta boa especificidade sem comprometer demasiadamente a sensibilidade diagnóstica (NUNES et al., 2008). O CMT é um exame de fácil execução, econômico e é um indicador de mastite subclínica (MOTA, 2008).

O grau de formação de gel a partir da mistura do leite e do bromocresol é proporcional à concentração de células somáticas e pontuado numa escala de 0 a 3 (McDOUGALL et al., 2001). O CMT apresenta limitações quando aplicado na espécie ovina, já que o teste foi originalmente desenvolvido para a espécie bovina, apresentando menor sensibilidade e especificidade quando utilizado no leite de ovelhas (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010b). Devido a subjetividade, o CMT pode apresentar erros na interpretação da formação de gel (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003).

A secreção do leite em cabras e ovelhas é apócrina, e partículas citoplasmáticas anucleadas e sem ácido desoxirribonucleico, semelhantes em tamanho a células somáticas, são constituintes normais do seu leite (MARTINS et al., 2013). Durante a lactação há o desprendimento normal das células do epitélio de revestimento dos alvéolos (GOMES et al., 2010). As células somáticas presentes no leite são principalmente as células epiteliais que foram descamadas do revestimento da glândula mamária e as células brancas do sangue (principalmente neutrófilos), que migraram para a glândula em resposta a uma lesão ou infecção (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011).

A CCS é um indicador da saúde da glândula mamária de vacas e ovelhas (SPANU et al., 2011) e pode ser utilizada para monitorizar o nível ou a ocorrência de mastite subclínica (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011). A CCS do leite de ovelhas abrange diferentes elementos celulares normalmente presentes, compreendendo os leucócitos e as células epiteliais (BLAGITZ et al., 2013). Há o aumento fisiológico natural da CCS no período seco e, após o parto, devido à redução de produção de leite e à migração, principalmente, de polimorfonucleares para proteção da glândula mamária (MORONI; CUCCURU, 2001; BLAGITZ et al., 2012), mas também é possível ocorrer alterações dos valores de acordo com a fase da infecção bacteriana (HARIHARAN et al., 2004). Congruente a isso, o aumento na CCS dos animais no período pós-

desmame pode explicar o aumento de um escore no CMT, independentemente do quadro infeccioso do animal, já que este está altamente relacionado com a CCS (McDOUGALL et al., 2001).

A CCS apresenta-se como um bom indicador do aumento da celularidade (NUNES et al., 2008). Glândulas mamárias de ovelhas apresentam resposta celular aumentada à infecção quando comparada com bovinas (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003). Segundo Berthelot et al. (2006), uma glândula pode ser considerada sem mastite quando a CCS é inferior a 0,5 x 10^6 células/ mL de leite e considerada com mastite quando a CCS for superior a 1,0 ou 1,2 x 10^6 células/ mL. Entretanto, segundo dados de literatura, tem-se utilizado como ponto de corte valores entre 0,3 e 1,7 x 10^6 células/ mL de leite para diferenciação entre glândulas ovinas saudáveis e infectadas (McDOUGALL et al., 2001).

Pengov (2001) observou que, das 130 amostras bacteriologicamente positivas, 91,1% apresentavam CCS maiores que 0,5 x 10^6 células/ mL e 98,8% eram maiores do que que 0,25 x 10^6 e concluiram que este último valor deve ser o limiar para determinação da mastite subclínica em ovelhas e pode ser considerado como o limite superior para a CCS normal do leite desta espécie. SCN resistentes à novobiocina, *Micrococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. produzem médias geométricas de CCS geralmente inferiores a 0,2 x 10^6 células/ mL (GONZALO et al., 2002). Estes resultados foram compartilhados por Ariznabarreta, Gonzalo e San Primitivo (2002), que observaram que glândulas infectadas com esses micro-organismos apresentavam valores de CCS entre 0,07 x 10^6 e 0,15 x 10^6 células/ mL de leite.

O diagnóstico etiológico pode ser realizado pelo cultivo microbiológico do leite em placas contendo meios de cultura como ágar acrescido de sangue ovino (5%) após amostras de leite serem colhidas assepticamente em frascos esterilizados com prévia higiene e desinfecção do óstio do teto com álcool a 70ºGL (MOTA, 2008). A cultura bacteriológica do leite é considerada o teste “padrão-ouro” para o diagnóstico de rotina das infecções intramamárias (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010b).

As investigações bacteriológicas são melhor realizadas em amostras de leite fresco. A possibilidade de reduzir resultados falso-negativos no exame

microbiológico é aumentada pelo armazenamento das amostras de leite (refrigeradas ou congeladas) que possuem apenas algumas espécies bacterianas, como *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas* spp. e *Micrococcus* spp. (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003).

O congelamento de amostras de leite destinadas ao exame microbiológico afeta de forma diferente a recuperação de SCN e bacilos Gram-negativos. A depender da temperatura e do período de estocagem, o número de SCN recuperados pode ser superior ao de amostras de leite submetidas ao exame microbiológico pós-ordenha, provavelmente devido à localização intracelular de *Staphylococcus* spp. e aos danos em células fagocíticas causados pela congelação. A recuperação dos bacilos Gram-negativos pós-congelação pode ser menor devido à diminuição na viabilidade desses micro-organismos, a exemplo de *E. coli* (SÁNCHEZ et al., 2003)

A temperatura de incubação influencia o isolamento microbiológico. A incubação das culturas à temperatura ambiente mostra-se prejudicial ao isolamento de *S. aureus* e de *M*. *haemolytica*, como também incubação a 42°C é prejudicial ao isolamento de outras espécies, incluindo *S. aureus*. A temperatura de incubação de 37°C utilizada rotineiramente é adequada para o isolamento da maioria dos agentes patogênicos responsáveis pela mastite subclínica ovina (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003).

Muitas amostras que apresentam elavada CCS podem não apresentar isolamento de bactérias quando forem cultivadas. O valor elevado da CCS na ausência de isolamento bacteriano em ágar sangue pode ser devido a fatores relacionados com as bactérias ou devido a fatores fisiológicos (HARIHARAN et al., 2004). A eliminação espontânea da infecção provocada por bactérias Gram-negativas pelo hospedeiro e condições especiais requeridas para o cultivo de determinados micro-organismos têm sido apontadas como causas de não isolamento (CLEMENTES; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003). A baixa concentração dos patógenos no leite, o padrão de eliminação intermitente de alguns micro-organismos, a localização intracelular de determinados patógenos e a presença de substâncias inibitórias no leite também podem influenciar no aparecimento de resultados falso-negativos no exame microbiológico (SILVA et al., 2010). Resultados falso-positivos também podem ocorrer, sobretudo devido

à presença de bactérias causando infecções insignificantes no canal do teto ou como contaminantes (ARSENAULT et al., 2008).

O diagnóstico da mastite baseado somente em um valor selecionado de CCS ou em uma contagem de colônias bacterianas no cultivo microbiológico em particular é problemático porque os autores utilizam diferentes valores de corte. Há uma falta de consenso de um valor aceito como "normal" e não há nenhum acordo sobre o número de colônias aceitável como significativo (HARIHARAN et al., 2004). Uma cultura pode ser considerada positiva quando houver o isolamento de pelo menos três colônias de um mesmo micro-organismo, exceto para *S. aureus*, que pode ser considerada como positiva a partir de uma colônia. Quando houver o isolamento de três ou mais micro-organismos, considera-se como contaminada (NMC, 1999).

Peixoto et al. (2010a) observaram concordância de 73% entre o exame microbiológico e o CMT a partir do escore ≥1+ ou ≥2+ e sugeriram que o limiar de ≥1+ pode ser empregado para diagnóstico de mastite subclínica nas ovelhas. A utilização do CMT para o diagnóstico da mastite subclínica em cabras e ovelhas deverá sempre ser associado ao exame microbiológico (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010b).

3.5. Tratamento da Ovelha Seca

A mastite pós-parto pode não ser necessariamente causada por uma nova infecção, mas por micro-organismos pré-existentes. Entre as medidas preventivas contra a mastite, o uso de antimicrobianos à secagem é amplamente reconhecido como um método preventivo e curativo da doença. Porém, esse tipo de manejo é pouco conhecido para a espécie ovina (PETRIDIS et al., 2013). A quantidade de antimicrobianos normalmente utilizada para o tratamento é mais elevada que a dose necessária para inativar os organismos patogênicos, o que favorece a produção de efeitos citotóxicos. Para uma terapia antimicrobiana de sucesso, a dose deve ser a mínima necessária, a fim de evitar os efeitos secundários (SAHA et al., 2007).

A inadequada limpeza do esfíncter do teto antes da inserção do dispositivo e a administração de subdosagens de antimicrobianos podem

acarretar falhas de tratamento (PENGOV; KIRBIS, 2009). Casos posteriores de mastite micótica podem ser consequência da infusão intramamária incorreta de antimicrobianos e dispositivos contaminados, o que realça a importância da higiene e de técnicas assépticas durante a administração de dispositivos intramamários e também indica a necessidade de melhor definição de doses eficazes para os tratamentos (SPANU et al., 2011).

O uso de antimicrobianos intramamários envolve escolhas científicas na seleção de medicamentos adequados para o tratamento (SMITH, 2010). A ausência de fármacos intramamários específicos para ovelhas faz com que em muitas vezes opte-se pelo uso de antimicrobianos intramusculares de amplo espectro (VERÍSSIMO et al., 2010; MELO et al., 2008) ou de antimastíticos idealizados para a espécie bovina (COUTINHO et al., 2006; PENGOV; KIRBIS, 2009), os quais são concebidos para atuação em glândula de dimensões superiores quando comparada com a glândula mamária ovina. Quando os antimicrobianos são administrados por via sistêmica, devem passar do sangue para dentro do úbere (SMITH, 2010).

Mesmo quando administrados por via intramamária, os antimicrobianos precisam atravessar membranas biológicas que funcionam como barreiras, as quais são transpassadas somente por fármacos lipossolúveis que não estão ligados às proteínas (SMITH, 2010). As barreiras potenciais à transferência das moléculas do fármaco entre o leite e o plasma, e em todo o tecido da glândula mamária incluem: membranas vasculares, membrana basal, membranas basais epiteliais, complexos juncionais paracelular e membranas epiteliais apicais (GEHRING; SMITH, 2006).

Diferentes antimicrobianos têm sido recomendados na terapia intramamária (NACCARI et al., 2003). Entretanto, são poucos os estudos conduzidos na investigação do perfil de sensibilidade da mastite ovina e são escassos ensaios clínicos controlados sobre a cura clínica e bacteriológica após o tratamento intramamário da ovelha (BERGONIER; BERTHELOT, 2003). As dosagens recomendadas nem sempre são adequadas para a cura completa do animal afetado quando aplicadas durante a lactação, e os padrões de excreção de antimicrobianos diferem muito entre as glândulas mamárias de ovinos e bovinos, fazendo com que o tempo de descarte de leite em ovelhas

em lactação seja superior, diante da persistência de resíduos dos fármacos (PENGOV; KIRBIS, 2009).

Administração intramamária de antibióticos de longa ação no período seco é um dos procedimentos mais eficazes para o controle de mastite em vacas lactantes (SPANU et al., 2011). Em ovelhas, Chaffer et al. (2003) conseguiram redução efetiva da prevalência de patógenos no leite pós-parto realizando a terapia no período seco com antimicrobianos intramamários. Spanu et al. (2011) evidenciaram redução da CCS na lactação subsequente de ovelhas tratadas no período seco.

O tratamento durante a fase seca da ovelha também é eficaz quando aplicado em rebanhos com alta prevalência de mastite. No entanto, questões como a cânula apropriada para a espécie e a dosagem do antimicrobiano devem ser abordadas em novos estudos (CHAFFER et al., 2003). Mavrogianni et al. (2006) utilizaram um cateter endovenoso médico nº 20 para coletar amostras no canal do teto, que se mostrou um método seguro e barato. Na inexistência de uma cânula adaptada à espécie ovina e a depender da velocidade de perfusão do antimicrobiano a ser utilizado na secagem, o método poderá ser adaptado para este fim.

Segundo Mavrogianni et al. (2011), a administração de antimicrobianos na fase de secagem das ovelhas possui dois objetivos: eliminar infecções intramamárias subclínicas pré-existentes (que podem causar recrudescimento da doença clínica) e prevenir novas infecções durante o período seco, quando as ovelhas são particularmente susceptíveis. A utilização de antimicrobianos no momento do desmame pode prevenir o aparecimento de mastites clínicas e a evolução para septicemia em ovelhas da raça Santa Inês (MELO et al., 2008).

A terapia de secagem da ovelha deve fazer parte da estratégia de controle de infecções mamárias por *S. aureus* nos rebanhos (CONTRERAS et al., 2007). Em contraste, com o tratamento da mastite clínica durante a lactação, o uso de antimicrobianos na secagem não apresenta limitações com o curto tempo para a administração desses medicamentos e pode ser realizado em grupos de animais, o que permite o tempo necessário para coleta de amostras destinadas ao exame microbiológico e de testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e, consequentemente, selecionar o agente

antimicrobiano com os melhores resultados para o uso mais adequado (MAVROGIANNI et al., 2011).

3.6. Terapia Antimicrobiana Convencional da Mastite Ovina

O antimicrobiano precisa satisfazer muitos critérios de seleção para uma melhor atividade, incluindo a capacidade de penetração, o tempo de retenção no tecido infectado, a distribuição intracelular, a expressão no sítio da infecção e a susceptibilidade da bactéria, com atenção para a fase de multiplicação (SILVERSTEIN; KABBASH, 1994). O grau de difusão dos fármacos na glândula mamária é diretamente proporcional à concentração não ionizada, à lipossolubilidade do fármaco e à capacidade de não se ligar às proteínas do sangue ou do leite (GEHRING; SMITH, 2006).

As alterações da permeabilidade vascular durante a mastite provocam alterações na composição do leite como o aumento do pH (causado principalmente pelo influxo de bicarbonato) e das células somáticas, e a diminuição das concentrações de caseína do leite e dos níveis de gordura. Essas mudanças podem impactar diretamente a farmacocinética dos fármacos intramamários (SMITH, 2010).

O grau de ionização do fármaco depende da constante de dissociação (pKa) e do pH da solução circundante (plasma ou leite). A maioria dos antimicrobianos são bases ou ácidos orgânicos fracos e estão na solução como formas ionizadas e não ionizadas simultaneamente (SMITH, 2010). O pKa do fármaco é o pH no qual 50% das moléculas do fármaco estão no estado ionizado. Para os ácidos orgânicos fracos, a proporção de fármaco na forma não ionizada aumenta conforme o pH do meio que o circunda torna-se mais ácido, ao passo que, para as bases orgânicas fracas, a proporção de droga não ionizada aumenta à medida que o pH do meio torna-se mais alcalino (GEHRING; SMITH, 2006).

A forma não ionizada geralmente é lipossolúvel e pode facilmente se difundir através das membranas lipídicas e junções do epitélio mamário, enquanto a forma ionizada não possui esta característica de difusão. O pH do leite (6,8) é ácido fraco em relação ao plasma (pH de 7,4), uma base fraca,

embora muitas vezes aumente com a mastite (GEHRING; SMITH, 2006). Para a terapia intramamária, ácidos fracos podem ser teoricamente preferidos às bases fracas porque a maior parte do fármaco estaria no estado não ionizado em comparação com as bases fracas. A parte da droga ionizada irá distribuir-se no leite ou poderá ser absorvida para o plasma sanguíneo e depois redistribuída para a glândula mamária (SMITH, 2010).

Os antimicrobianos β-lactâmicos são, provavelmente, a classe mais utilizada dos antibióticos em medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas e são compostos basicamente de dois tipos: as penicilinas e as cefalosporinas. As penicilinas são formadas por cadeias laterais volumosas ligadas a um núcleo de ácido 6-aminopenicilânico (BOGIALLI; Di CORCIA, 2009). Existem muitas penicilinas diferentes. Entretanto, todas são derivadas do ácido 6-aminopenicilânico e possuem uma estrutura básica que consiste em um anel tiazolidínico ligado a um anel *β*-lactâmico. O núcleo da penicilina é o principal componente para atividade biológica da substância. Transformações metabólicas ou alterações químicas dessa parte da molécula provocam perda significativa da atividade antibacteriana (CIONE; LIBERALE; SILVA, 2010).

As penicilinas são predominantemente ionizadas no plasma sanguíneo e possuem pequenos volumes aparentes de distribuição. No plasma, o alto grau de ionização e a baixa solubilidade em lipídeos fazem com que atinjam baixas concentrações intracelulares e não penetrem bem em líquidos intercelulares. A excreção das penicilinas é quase totalmente renal (PRESCOTT, 2003). Uma pobre penetração e diminuição da atividade dentro da célula são as maiores razões para a limitada atividade da maioria dos antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos) em infecções intracelulares (SILVERSTEIN; KABBASH, 1994). No entanto, é geralmente admitido que a maioria dos antimicrobianos intramamários é capaz de penetrar melhor nos tecidos mais profundos do úbere durante a mastite, devido ao rompimento das junções das células endoteliais (SMITH, 2010).

A solubilidade lipídica é outra propriedade físico-química que controla a distribuição de um fármaco. Os fármacos com maiores coeficientes de solubilidade lipídica são absorvidos mais rapidamente na glândula mamária do

que aqueles que são mais solúveis em água (SMITH, 2010). Kietzmann, Niedorf e Gossellin (2010) observaram concentrações potencialmente eficazes em todas as regiões da glândula mamária bovina após infusão de uma formulação comercial para secagem contendo 600 mg de cloxacilina benzatina.

Os antimicrobianos β-lactâmicos interferem na síntese da parede celular ao evitar a ligação cruzada final da parede, inibindo a divisão e criando pontos fracos. Bloqueiam a síntese de peptidoglicanos, enfraquecem a parede celular e promovem a ação de autolisinas que lisam as células. A maior atividade de alguns antimicrobianos *β*-lactâmicos contra bactérias Gram-positivas é resultante da maior quantidade de peptidoglicano e da maior pressão osmótica nestas células, da impermeabilidade de algumas bactérias Gram-negativas em razão dos lipopolissacarídeos e lipídeos exteriores, e da presença de enzimas *β*-lactamases (PRESCOTT, 2003).

As penicilinas são consideravelmente livres de efeitos tóxicos, mesmo em doses equivocadamente excessivas em relação às recomendadas. O maior efeito adverso é anafilaxia aguda, mas são mais comuns as reações de hipersensibilidade mais moderadas, como urticácia, febre e edema angioneurótico (PRESCOTT, 2003).

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos (antibiogramas) são importantes para avaliação da eficácia dos tratamentos a serem empregados e para seleção dos fármacos para o tratamento (CRAVEN, 1987). Quando diagnosticada a mastite, o tratamento deve ser realizado utilizando antimicrobianos eficazes (BUSWELL; BARBER, 1989). A resistência dos micro-organismos isolados de infecções intramamárias demonstra a importância da realização de testes prévios de identificação do agente causal e da sua sensibilidade antimicrobiana, com o intuito de eleger o tratamento mais apropriado (COUTINHO et al., 2006). Em pequenos ruminantes não há protocolos detalhados para tratamento da mastite (BERGONIER et al., 2003).

A técnica padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para detecção de resistência a oxacilina de *S. aureus* e SCN passou a ser realizada com discos de 30 µg de cefoxitina para aumento de especificidade (AZEVEDO et al., 2007). O teste de disco-difusão, incluindo o disco de cefoxitina, quando se utilizam os novos pontos de corte do CLSI,

parece boa opção, tanto em relação aos custos como em relação à acurácia. No entanto, pode haver erros de diagnósticos com o uso deste método em detrimento ao uso da oxacilina (CLSI, 2012).

O teste com o disco de cefoxitina tem a finalidade de detectar resistência à oxacilina e não à própria cefoxitina (MIMICA; MENDES, 2007). O teste de disco-difusão com a oxacilina é mais sensível, embora menos específico do que o teste com a cefoxitina. Assim, os dois discos de oxacilina e cefoxitina devem ser incluídos simultaneamente para confirmação da resistência à meticilina e à oxacilina (JAIN; AGARWAL; VERMA, 2008). *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina são resistentes a todos os antimicrobianos β-lactâmicos, com exceção das mais novas cefalosporinas. A resistência evidenciada com discos de oxacilina e cefoxitina é extrapolada para as outras penicilinas, como cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina (CLSI, 2012).

Nas bactérias Gram-positivas (particulamente *S. aureus*), ocorre resistência às penicilinas principalmente pela produção de enzimas *β*-lactamases, que quebram o anel beta-lactâmico. A resistência em bactérias Gram-negativas resulta de uma grande variedade de enzimas *β*-lactamases, baixa permeabilidade bacteriana ou falta de receptores para as penicilinas. A produção de *β*-lactamases mediadas por plasmídeos é amplamente difundida entre patógenos Gram-negativos e as do tipo OXA são capazes de hidrolisar as penicilinas isoxazolil (PRESCOTT, 2003).

Cloxacilina é conhecido como antimicrobiano eficaz contra estafilococos resistentes à penicilina (KIETZMANN; NIEDORF; GOSSELLIN, 2010). A cloxacilina é relativamente resistente às *β*-lactamases estafilocócicas, mas com menor atividade que a penicilina G contra organismos Gram-positivos sensíveis e inativa contra bactérias Gram-negativas (PRESCOTT, 2003). A cloxacilina é um ácido fraco de moderada lipossolubilidade (coeficiente de 2,7) e com pKa de 2,44 (SMITH, 2010). Vários produtos contendo cloxacilina benzatina em suspensões intramamárias são registrados para bovinos como antibióticos para uso na secagem. Estas formulações são recomendadas para utilização rotineira em vacas para tratar infecções intramamárias na lactação e para oferecer proteção prolongada contra novas infecções durante o período seco (KIETZMANN; NIEDORF; GOSSELLIN, 2010).

3.7. A Nanotecnologia na Terapia de Infecções

Diversas pesquisas foram realizadas nos últimos anos avaliando vetores de liberação de fármacos em sítios específicos quanto a eficiência e citotoxicidade (BILENSOY et al., 2008). A nanotecnologia é definida como a invenção, caracterização e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas para controlar a forma de substâncias e seu tamanho no nível de uma escala nanométrica (WONG; LIU, 2012). Um nanômetro representa um bilionésimo de um metro (10^{-9}m). A introdução da nanotecnologia na área farmacêutica revolucionou as possibilidades de veiculação de drogas ao aumentar as possibilidades para os novos tratamentos emergentes (IRACHE et al., 2011). O uso associado de substâncias orgânicas e inorgânicas por meio da nanotecnologia possibilitou melhor perspectiva para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas para o controle de infecções (GOLUBEVA et al., 2011).

As nanopartículas representam formas inovadoras no tratamento de doenças por sua escala de tamanho ser semelhante à de moléculas biológicas (WIESENTHAL et al., 2011). Dentre suas vantagens, apresentam-se como veículos de fármacos de alta estabilidade, elevada capacidade de carga transportada, possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas conjuntamente (IRACHE et al., 2011), capacidade em superar diversas barreiras biológicas e se localizar no tecido alvo. As nanopartículas podem ser um carreador ou a própria droga ativa e fornecem perfis de liberação controlada (WONG; LIU, 2012). O carregamento de drogas por meio de encapsulação, adsorção ou conjugação química com nanopartículas melhora a farmacocinética e o índice terapêutico dos medicamentos quando comparados com os homólogos da droga livre (ZHANG et al., 2010).

Para o sucesso da terapia com nanopartículas conjugadas a antimicrobianos, as atividades devem ser devidamente avaliadas, porque a quantidade de antimicrobiano normalmente utilizado para o tratamento convencional é maior do que a dose necessária para inativar os organismos patogênicos, o que pode proporcionar efeitos tóxicos (SAHA et al., 2007). A toxicidade antimicrobiana para os tecidos saudáveis representa uma limitação importante à utilização de antimicrobianos (ZHANG et al., 2010).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm, estruturadas em nanocápsulas ou nanoesferas, diferindo na composição e na organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de antimicrobianos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Um dos principais tipos de nanopartículas poliméricas para a entrega do antimicrobiano é constituido por polímeros compostos de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. O segmento hidrofóbico forma um núcleo contendo o fármaco, enquanto o segmento hidrofílico terá como função proteger o núcleo da opzonização e degradação. A taxa de liberação da droga pode ser sintonizada por variação do comprimento da cadeia hidrofóbica. Um outro tipo consiste em polímeros lineares como acrilatos formados por meio de polimerização em emulssão, onde drogas antimicrobianas podem ser adsorvidas às nanocápsulas ou conjugadas covalentemente à superfície das nanopartículas. No entanto, fármacos hidrofílicos podem ser inativados por essas ligações covalentes (ZHANG et al., 2010).

As nanopartículas poliméricas são estruturalmente estáveis e podem ser sintetizadas com distribuições de tamanhos mais nítidos. As propriedades da partícula tais como o tamanho, potencial zeta e o perfil de liberação do fármaco podem ser ajustadas precisamente escolhendo diferentes comprimentos de polímeros, surfactantes e solventes orgânicos durante a síntese. A superfície de nanopartículas poliméricas geralmente contém grupos funcionais que podem ser modificados quimicamente (ZHANG et al., 2010). As nanocápsulas podem ter dificuldade de atravessar determinadas barreiras epiteliais e ficarem retidas por mais tempo em um local (PREGO et al., 2006).

A utilização de moléculas específicas adicionadas à superfície das nanocápsulas permite o reconhecimento molecular do tecido-alvo ou a liberação da carga transportada no local da doença (WONG; LIU, 2012). Para

a entrega direcionada antimicrobiana, as nanopartículas poliméricas têm sido frequentemente confeccionadas com lecitina, que é uma proteína que se liga a hidratos de carbono simples ou complexos presentes em paredes celulares bacterianas (ZHANG et al., 2010). Nanocápsulas podem ser compostas por núcleo oleoso, convenientemente estabilizado com lecitina e rodeado por um revestimento de quitosana (PREGO et al., 2006).

Uma variedade de polímeros biodegradáveis têm sido utilizados para formar o núcleo polimérico hidrofóbico (ZHANG et al., 2010). Dentre estes, a poli-Ɛ-caprolactona é especialmente interessante para a preparação de dispositivos de longo prazo devido a sua degradação lenta por meio de hidrólise das suas ligações éster em condições fisiológicas, e pode ser utilizada para carrear muitas substâncias como hormônios, antimicrobianos e antifúngicos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

A quitosana atraiu a atenção de cientistas farmacêuticos como um polímero mucoadesivo, o qual pode aderir aos tecidos duros e macios, como os tecidos epiteliais, e ao revestimento de muco presente na superfície dos tecidos (SENEL; McCLURE, 2004), o que pode favorecer a liberação controlada no epitélio glandular mamário. Quando a quitosana participa como um transportador, o polímero pode mover-se em associação com o veículo e penetrar na mucosa. O revestimento de quitosana não afeta a associação do nanocarreador com as células (PREGO et al., 2006). A quitosana é um polímero parcialmente desacetilado da acetil glucosamina obtida após desacetilação alcalina da quitina. Compreende copolímeros de glucosamina e N-acetil glucosamina e engloba uma série de polímeros, que variam em peso molecular entre 10.000 e 2.000.000 de daltons (SENEL; McCLURE, 2004).

Devido ao elevado peso molecular e a uma estrutura linear, a quitosana é excelente agente de aumento da viscosidade. Por ser hidrofílica, mostra-se capaz de reter a água na sua estrutura (SENEL; McCLURE, 2004). A formação do revestimento de quitosana é mediada pela interação entre os fosfolípidos com carga negativa e as moléculas de quitosana de cargas positivas (PREGO et al., 2006). A molécula é carregada positivamente após os grupos amino sofrerem dissolução em meio ácido. No entanto, em pH neutro a maioria das moléculas de quitosana perde carga. Além da ausência de toxicidade e

alergenicidade, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a bioatividade tornam a substância muito utilizada (SENEL; McCLURE, 2004).

Durante o encapsulamento, o fármaco pode ter uma parte agregada na superfície de revestimento de quitosana e ficar disponível para liberação rápida, enquanto a maior parte permanece encapsulada e exige certo tempo para evadir-se do transportador (PREGO et al., 2006).

A quitosana é facilmente hidrolisada por várias quitosanases. A biodegradação conduz à liberação de açúcares aminados, que podem ser incorporados a glicosaminoglicanos ou glicoproteínas por vias metabólicas ou serem excretados. Polímeros altamente desacetilados podem durar vários meses *in vivo*, ao passo que as amostras com menor grau de desacetilação degradam-se mais rapidamente (SENEL; McCLURE, 2004).

Os mecanismos de liberação do fármaco são tão importantes como a formulação de polímero carreador para o sucesso da entrega no local de ação. A liberação ocorre por dissociação do fármaco ligado à superfície, da difusão através da matriz das nanopartículas, da difusão através da parede das nanocápsulas poliméricas, da erosão da matriz das nanopartículas e/ou de um processo de erosão-difusão combinada (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Lecároz et al. (2006) estudaram o efeito *in vitro* da gentamicina nanoparticulada em estrutura de nanoesferas e evidenciaram a eficiência do antibiótico ao ser melhor direcionado ao sítio de ação da *Brucella melitensis* no interior das células macrofágicas. No entanto, até o presente momento, os resultados obtidos *in vitro* utilizando fármacos em estruturas nanoparticuladas continuam sendo de difícil reprodução na clínica (IRACHE et al., 2011).

Para uma terapia antimicrobiana bem-sucedida, a dose deve ser reduzida para evitar os efeitos secundários. Ao mesmo tempo, a estabilidade deve ser aumentada, para tornar os tratamentos mais econômicos (SAHA et al., 2007).

3.8. Análise de Resíduos no Leite

Antimicrobianos considerados ácidos fracos, como as penicilinas e as cefalosporinas, tendem a alcançar baixos níveis na glândula mamária quando administrados sistemicamente e, ao serem administrados por via intramamária, tendem a se difundir rapidamente para a circulação sanguínea. No entanto, em uma glândula mamária com mastite, o pH tende a ficar mais próximo ao do sangue, o que reduz a difusão da droga para dentro da glândula mamária (FOLLY et al., 2008). Devido à falta de antibióticos formulados especificamente para ovelhas, muitos daqueles produzidos para uso na glândula mamária bovina são utilizados para tratar infecções da glândula mamária ovina. No entanto, os intervalos de segurança para ausência de excreção de resíduos são adaptados às vacas e não são necessariamente válidos para as ovelhas (BERGONIER et al., 2003).

Poucas são as informações acerca de resíduos antimicrobianos após o tratamento intramamário de ovelhas. Zhao, Zhang e Gan (2004) desenvolveram um método para analisar resíduos de tetraciclinas no leite de ovelhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com um sistema conjunto de eletrodos calorimétricos, uma coluna cromatográfica C18 e uma fase móvel com fosfato de sódio monobásico di-hidratado e acetonitrila, o qual mostrou-se simples, preciso, seletivo e permitiu detectar uma concentração de resíduos abaixo do Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Os métodos analíticos para monitorar resíduos de medicamentos veterinários devem ser rápidos, específicos e sensíveis para permitir a detecção da droga em baixas concentrações. Esses métodos envolvem uma etapa de preparo da amostra, ou seja, a extração do resíduo da matriz em estudo previamente à análise. O LMR é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/ kg, mg/ L, µg/ kg ou µg/ L de alimento) que se pode aceitar. O LMR baseia-se no tipo e na quantidade de resíduos que não apresentam risco de toxicidade para a saúde humana, levando-se em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), as boas práticas veterinárias e a presença de resíduos no ambiente (ANVISA, 2013).

Para a interpretação dos resultados obtidos no Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), utilizam-se LMR de medicamentos veterinários harmonizados no Mercosul (Resolução GMC n. 54/2000). Para aqueles medicamentos veterinários cujos valores de LMR não estão estabelecidos no Mercosul, utilizam-se os valores preconizados pelo Codex Alimentarius, e na ausência desses, aqueles estabelecidos pela União Europeia (ANVISA, 2013). Para proteger a segurança dos consumidores, a União Europeia regulamenta o uso de antimicrobianos, principalmente em espécies de alimentos de origem animal, mediante a emissão de vários regulamentos (BOGIALLI; Di CORCIA, 2009).

Anastassiades et al. (2003) introduziram um método de preparo de amostra descrito como rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), para análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais e que pode ser utilizado para outras matrizes. Em conjunto com Lehotay, Mastovska e Yun (2005), Anastassiades et al. (2003) relataram como vantagens apresentadas por este método: a rapidez de análise, o pequeno consumo de solventes e a geração de poucos resíduos, a possibilidade de execução do método por uma única pessoa, a utilização de pouco material, a robustez e o baixo custo dos reagentes utilizados.

Meyer et al. (2011) verificaram que a alimentação durante a gestação da ovelha influencia a quantidade e a composição do colostro. O colostro pode apresentar uma variação nas seguintes composições: gordura (de 12,3% a 14,1%), lactose (de 2,32% a 2,52%), proteína (de 16,6% a 17,9%) e CCS (de 581 a 1.193 x 10^3). Não existe Limite Máximo de Resíduo regulamentado para cloxacilina no colostro de ovelhas. No entanto, baseando na matriz leite de bovinos, o nível de resíduo máximo de cloxacilina considerado satisfatório pela União Europeia é de 30 µg/ L (ANVISA, 2013).

O processo de preparação da amostra para análise de resíduos de antibióticos β-lactâmicos deve levar em consideração a presença de um anel de quatro membros instável na estrutura β-lactâmica, o que torna esses

compostos propensos à degradação pelo calor e por alcoóis. As penicilinas são também facilmente isomerizadas em um ambiente ácido, e as precauções durante o método de extração devem ser tomadas para evitar a degradação do analito (BOGIALLI; Di CORCIA, 2009).

As técnicas de separação, como a cromatografia em fase gasosa, a CLAE e a eletroforese capilar, têm sido largamente utilizadas para a análise de contaminantes em amostras de alimentos, as quais mostram-se como matrizes de alta complexidade (BOGIALLI; Di CORCIA, 2009). Nos últimos anos houve o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos, bem como acoplamento ao espectrômetro de massas, tornando possível detectar grande quantidade de compostos e analisar traços em amostras complexas (MALDANER; JARDIM, 2009).

A cromatografia representa o mais relevante conjunto de técnicas analíticas disponíveis atualmente para análise de substâncias químicas (CASS; DEGANI, 2001), em especial a cromatografia líquida, devido aos baixos limites de detecção que podem ser alcançados com a técnica. A cromatografia líquida emprega uma fase móvel líquida, que é bombeada por uma bomba de alta pressão e atua como carregador da amostra, fazendo-a percorrer a coluna cromatográfica, a qual é revestida internamente com uma fase estacionária. A separação ocorre pelas diferentes interações da fase móvel com os componentes da amostra e com a fase que reveste a coluna. Para identificar os compostos separados na cromatografia líquida podem ser utilizados diversos tipos de detectores, sendo os mais comuns: índice de refração, ultravioleta-visível (fotômetro, espectrofotômetro e arranjo de diodos), fluorescência, eletroquímico, espectrometria de massas e espalhamento de luz (CASS; DEGANI, 2001; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

O desenvolvimento significativo na detecção de resíduos alcançado na última década foi consequência do uso intenso da CLAE no mundo todo como uma técnica de análise de rotina em laboratórios. O método analítico para monitoramento de rotina dos resíduos no leite deve ser preciso, rápido, simples, econômico e capaz de detectar os resíduos abaixo dos LMR (MALDANER; JARDIM 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local, Período e Animais Experimentais

O trabalho foi realizado em um rebanho pertencente a uma propriedade localizada no município de São Carlos, São Paulo, entre junho de 2012 e outubro de 2013. Analisou-se um total de 393 mamas de ovelhas de aptidão para produção de carne, 250 das quais pertencentes a 130 ovelhas da raça Santa Inês e outras 143 mamas de 77 ovelhas da raça Morada Nova, submetidas ao mesmo sistema de manejo semi-intensivo.

Todos os animais foram mantidos em piquetes de capim Coast-cross e *Brachiaria decumbens* e suplementados com fornecimento diário de silagem de milho, sal mineral e água à vontade durante todo o período do experimento. Os animais foram suplementados com ração concentrada no sistema de *flushing*, no último mês de gestação e *creep feeding* para os cordeiros.

O manejo reprodutivo foi realizado por monta natural com reprodutores das referidas raças, submetidos a dois exames andrológicos com intervalo de 60 dias, previamente à estação de acasalamento. As fêmeas em Índice de Escore Corporal (IEC) entre 2 e 3 (escala de 1 a 5) foram colocadas juntas ao macho por um período de 60 dias. No manejo sanitário, empregou-se vacinação contra as clostridioses 45 e 15 dias antes do parto e, após esse período, semestralmente. Os animais foram avaliados 21 dias antes das estações de acasalamento para identificação de sinais clínicos de verminose e submetidos ao casqueamento preventivo. Os locais onde os animais eram recolhidos para repouso ou se abrigarem da chuva eram limpos constantemente. No entanto, fezes e umidade estiveram sempre presentes.

Os cordeiros dos animais submetidos aos grupos experimentais foram desmamados em um intervalo médio de 100 dias pós-nascimento. As matrizes foram examinadas periodicamente para diagnóstico precoce da mastite clínica.

4.2. Coletas das Amostras de Leite

As amostras de leite foram coletadas posteriormente ao exame físico da glândula mamária, à lavagem das mãos do ordenhador com água e sabão e a antissepsia com álcool isopropílico 70% dos esfíncteres dos tetos, obedecendo aos seguintes critérios: 10 dias antes do desmame (animais submetidos à triagem para distribuição nos grupos experimentais) e no 13º dia pós-parto em média na estação de parição consecutiva (animais submetidos às avaliações pós-tratamentos), foi coletada uma amostra de leite (2 mL) de cada glândula para a realização imediata do CMT, uma amostra de 60 mL de leite de cada glândula, acondicionada em recipientes plásticos contendo conservante bronopol a serem encaminhadas para a contagem de células somáticas (CCS) eletrônica, e duas amostras contendo 5 mL de leite de cada mama da ovelha acondicionadas em tubos de vidro esterilizados e destinadas aos exames microbiológicos.

4.3. Realização do CMT e da Contagem de Células Somáticas

As amostras de leite submetidas ao CMT foram avaliadas segundo a técnica descrita por Schalm e Noorlander (1957), após a mistura de 2 mL de leite de cada glândula com a mesma quantidade do reagente CMT (detergente tensoativo aniônico neutro). Após leve homogeneização, as amostras foram classificadas segundo o grau de viscosidade em quatro escores distintos: negativo, fracamente positivo (1+), positivo (2+) ou fortemente positivo (3+).

As amostras destinadas à CCS foram encaminhadas para o laboratório da Clínica do Leite, localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo, onde foram realizados os procedimentos de contagem em aparelho eletrônico, Somacount 300 (Bentley Instruments®) calibrado com leite bovino.

4.4. Diagnóstico Microbiológico

O diagnóstico microbiológico da mastite subclínica foi realizado nos laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste, após a semeadura sobre a superfície de placas de Petri em meios de cultura ágar acrescido de sangue ovino desfibrinado a 5% e MacConkey, incubadas em condições de aerobiose a 37°C por até 72 horas, com leituras das placas realizadas a intervalos de 24 horas.

Foram observadas as características macroscópicas das colônias (Figuras 1 e 2), como morfologia, produção de pigmento e hemólise, com identificação dos micro-organismos segundo as características morfotintoriais (Figuras 3) e bioquímicas (Figuras 4 e 5) (KONEMAN et al., 2001). A interpretação dos resultados dos exames microbiológicos foi realizada de acordo com Harmon et al. (1990). A fita de oxidase e o disco de furazolidona (FRZ-100 µg) foram utilizados na técnica de difusão em disco para diferenciar o gênero *Staphylococcus* (sensível; halos ≥ 15 mm) de *Micrococcus* (resistente; halos ≤ 14 mm; BAKER, 1984).



Figura 1. Colônias cinzas e amarelas sugestivas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue ovino a 5%



Figura 2. Colônias cinzas e pequenas sugestivas de *Streptococcus* spp. em ágar sangue ovino a 5%

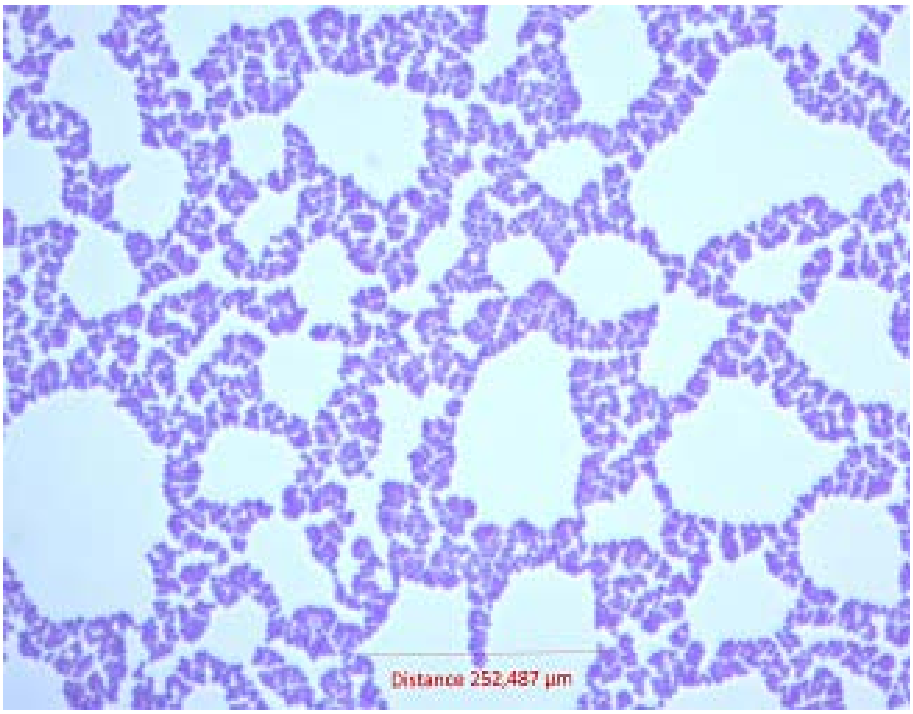


Figura 3. Cocos Gram-positivos em formato de cacho de uvas visualizados na colocarção de Gram (aumento de 1000 vezes).

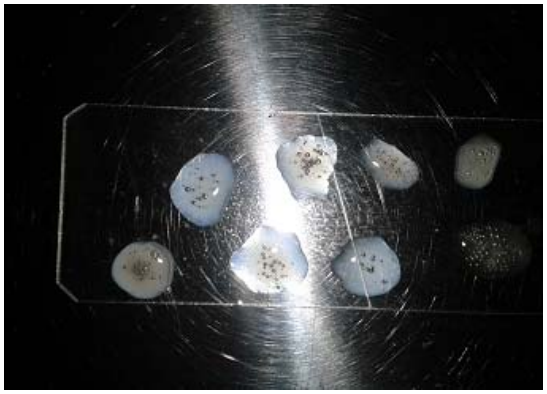


Figura 4. Prova da catalase ilustrando resultados positivos ao teste.



Figura 5. Prova da coagulase lenta com uma amostra positiva, controles positivo e negativo (sequenciados de cima para baixo).

4.5. Determinação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

Os micro-organismos isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão com disco (BAUER et al., 1966) em placas de ágar Müeller-Hinton ou Müeller-Hinton-sangue, na dependência do micro-organismo isolado, frente à oxacilina (OXA-1µg). Utilizou-se conjuntamente o disco de cefoxitina (CFO-30 µg) quando isolados os *Staphylococcus* spp. Decorridas 24 horas de incubação a 35^{o}C, foi realizada a aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

4.6. Determinação da Mastite Subclínica por Micro-organismos

As glândulas mamárias que não apresentavam anormalidades clínicas detectáveis e foram bacteriologicamente positivas, com escore positivo ao CMT ou CCS > 2,5 x 10^5 células/ mL de leite (PENGOV*,* 2001), foram consideradas positivas para mastite subclínica. Já as glândulas mamárias que não apresentaram anormalidades clínicas e foram bacteriologicamente negativas, com escore negativo ao CMT e CCS < 2,5 x 10^5 células/ mL, foram consideradas saudáveis.

4.7. Tratamentos Experimentais

4.7.1. Grupos Experimentais

Os tratamentos experimentais estudados foram avaliados com relação a dois parâmetros:

I - Avaliação quanto à capacidade de curar glândulas mamárias ovinas com mastite subclínica. Para tanto, as glândulas mamárias dos animais experimentais foram distribuídas nos seguintes grupos:

a) G1 (Controle, n = 21 mamas de 17 animais): Glândulas mamárias com mastites subclínicas, que não receberam tratamento antimicrobiano intramamário;

b) G2 (n = 21 mamas de 18 animais): Glândulas mamárias com mastites subclínicas em que foi administrado o antimicrobiano Convencional (100 mg de cloxacilina benzatina/ 10 mL);
c) G3 (n = 20 mamas de 19 animais): Glândulas mamárias com mastites subclínicas em que foi administrado o antimicrobiano Nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina benzatina/ 86 mL).

II – Avaliação quanto à capacidade de prevenção de novas infecções em glândulas mamárias ovinas saudáveis. Para tanto, as glândulas mamárias dos animais experimentais foram distribuídas nos seguintes grupos:
a) G1 (Controle, n = 7 mamas de 7 animais): Glândulas mamárias saudáveis, que não receberam tratamento antimicrobiano intramamário;
b) G2 (n = 14 mamas de 14 animais): Glândulas mamárias saudáveis em que foi administrado o antimicrobiano Convencional (100 mg de cloxacilina benzatina/ 10 mL);
c) G3 (n = 8 mamas de 8 animais): Glândulas mamárias saudáveis em que foi administrado o antimicrobiano Nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina benzatina/ 86 mL).
d) G4 (n = 10 mamas de 5 animais): Glândulas mamárias saudáveis em que foi administrado o antimicrobiano Nanoencapsulado (100 mg de cloxacilina benzatina/ 172 mL).

A concentração do antimicrobiano convencional igual a 100 mg de cloxacilina benzatina foi escolhida para avaliação baseando-se no peso da glândula mamária de ovelhas de corte, que foi estimado entre 1/5 e 1/6 do peso da glândula mamária de vacas leiteiras, aproximadamente, e na existência de produtos comerciais com este princípio ativo para uso em bovinos, usualmente apresentando a quantidade de 500 mg ou 600 mg.

As quantidades do antimicrobiano nanoparticulado de 50 e 100 mg de cloxacilina benzatina foi escolhida baseando-se no limite de redução de volume do antimicrobiano, que não permitia uma concentração inferior a 50 mg/ 86 mL sem ocorrer aglutinação, e no limite de volume suportado pela glândula mamária das ovelhas de corte. Em estudo piloto, foi observado que as mamas saudáveis apresentavam dimensões capazes de suportar no máximo 172 mL de volume final, enquanto as mamas acometidas com mastite subclínica

possuíam capacidade inferior, suportando somente 86 mL de volume infundido intramamário.

4.7.2. Elaboração dos Antimicrobianos

4.7.2.1. Antimicrobiano Nanoencapsulado

O antimicrobiano nanoencapsulado foi produzido nos laboratórios da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, de acordo com a metodologia descrita na patente publicada nº US2013/0189368A1. Os nanocarreadores contendo a cloxacilina benzatina foram confeccionados com os seguintes componentes (% v:v): poli-Ɛ-caprolactona (PCL; P42500Da; Sigma, USA) (0,80%); lecitina de soja (0,40%); triglicerídeos de ácido cáprico/ caprílico (Labrafac CC) (0,25%); poloxâmero 188 (Pluronic F68) (0,60%); quitosana (Sigma, USA) (0,10%); cloxacilina benzatina estéril (Sigma, USA) (0,25%); e água MilliQ (100%).

Para a preparação das nanocápsulas contendo cloxacilina benzatina, o polímero poli-Ɛ-caprolactona (PCL) foi diluído em 23 mL de uma solução de acetona contendo lecitina de soja (Epikuron 170) e labrafac CC. A cloxacilina benzatina foi previamente solubilizada em 7 mL de metanol e adicionada a uma solução de acetona. Esta fase permaneceu por ação de calor e de agitação moderada (entre 30 e 45°C) até a dissolução completa dos componentes. Subsequentemente, a solução orgânica foi rediluída em solução aquosa previamente preparada contendo poloxâmero 188 e 10 mg de quitosana de baixo peso molecular solúvel em água, seguido por agitação a uma velocidade moderada a temperatura ambiente por meio de agitador magnético durante 10 minutos. Depois, a suspensão foi levada ao evaporador rotativo, mantendo a temperatura do banho entre 40 e 45°C para a evaporação dos solventes a pressão reduzida. O tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas obtidas foram 291nm e +16mV, respectivamente. A eficiência de encapsulação foi de 87%.

As nanopartículas confeccionadas foram compostas por um núcleo oleoso formado por polímero hidrofóbico associado à cloxacilina benzatina e

coberto por uma membrana polimérica catiônica dispersa em um meio aquoso externo. A concentração do fármaco foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) durante a validação do método para obtenção da respectiva patente. Após a encapsulação, a solução foi congelada a -85ºC por 24 horas e submetida à secagem por liofilização. O soluto foi resuspendido em água MilliQ para concentração final de 50 mg de cloxacilina benzatina/ 86 mL de solução, baseando-se no volume de aplicação de menor diluição possível do fármaco, que não favorecesse aglutinações macroscópicas e que fosse suportado pelos limites físicos da glândula mamária ovina. A dose a ser aplicada foi acondicionada em duas seringas plásticas estéreis com êmbolo plástico de volume de 60 mL.

4.7.2.2. Antimicrobiano Convencional (Forma Livre)

O antimicrobiano convencional foi confeccionado por meio da solubilização de 100 mg de cloxacilina benzatina estéril em triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico grau farmacêutico, em volume total de 10 mL e acondicionado em seringas plásticas estéreis de mesmo volume.

4.7.3. Administração de Antimicrobianos Via Intramamária

O tratamento intramamário foi realizado três dias após o desmame dos cordeiros após a esgota manual completa do úbere e antissepsia com álcool isopropílico 70% dos esfíncteres dos tetos. Uma vez que não existem cânulas apropriadas à espécie ovina para infusão intramamária dos antimicrobianos nos animais experimentais, adaptou-se o método descrito por Mavrogianni et al. (2007b), o qual foi utilizado primariamente para coleta de amostras da microbiota do canal do teto sem causar lesões no tecido local. Para tanto, utilizou-se a estrutura flexível de um cateter intravenoso tamanho nº 20 (1,1 mm x 48 mm; calibre x comprimento) estéril para cada tratamento intramamário, adentrando apenas meio centímetro ao canal do teto.

Após a infusão do medicamento foi efetuada massagem das mamas para a melhor distribuição do produto. Durante a administração do antimicrobiano nanoencapsulado foi consumido maior tempo devido ao grande volume infundido. Realizaram-se exames clínicos dos aparelhos mamários através de palpação e inspeção antes do tratamento, durante, uma e 24 horas após. Todos os animais dos grupos experimentais permaneceram juntos e foram submetidos ao mesmo manejo semi-intensivo.

4.8. Determinação da Cura Microbiológica

Na lactação posterior, as mamas dos diferentes grupos experimentais foram classificadas como “curadas”, quando não houve o isolamento dos micro-organismos que estavam presentes antes do tratamento, ou “não curadas”, quando o mesmo patógeno presente antes do tratamento foi isolado posteriormente na metade mamária. Mamas reinfectadas, ou seja, naquelas em que houve o aparecimento de um micro-organismo diferente do isolado na fase de secagem ou o surgimento de um micro-organismo em uma metade mamária não infectada na fase de secagem, foram consideradas como não curadas, de acordo com recomendações para bovinos (EUROPEAN COMISSION, 1993). Para a confirmação da cura microbiológica foram realizadas duas coletas de amostras consecutivas com o intervalo médio 15 dias em conjunto com o CMT e a CCS, que deveriam apresentar resultado negativo e contagem inferior a 2,5 x 10^5 células/ mL, respectivamente. Os animais que apresentaram evolução para mastite clínica antes dos tratamentos experimentais foram retirados do estudo.

4.9. Identificação de Resíduos de Cloxacilina no Colostro Ovino

O desenvolvimento do método de extração e a análise de resíduos de cloxacilina no colostro ovino foram realizados nos laboratórios do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (Universidade de São Paulo – Campus de São Carlos). Após a padronização do método, foi obtida a concentração máxima quantificável de 1

mg/ L e determinado o tempo de retenção da cloxacilina de 1,72 minutos. No laboratório as amostras extraídas foram analisadas por CLAE-DAD, comprimento de onda de 225 nm, fase móvel tampão bifosfato/acetonitrila – 70% / 30%, coluna C18 (Phenomenex, 10 mm x 4,6 mm x 2,7 µm), fluxo de 1 mL/ min, volume injetado de 20 µL. A equação da reta foi y = 44x – 1,44 e o coeficiente de correlação foi r = 0,998.

No dia do parto, foram coletadas e congeladas para posterior análise de 68 amostras contendo 10 mL de colostro de glândulas mamárias tratadas à secagem com as seguintes características:

a) 23 mamas com mastite subclínica pertencentes ao Grupo 2;
b) 13 mamas com mastite subclínica pertencentes ao Grupo 3;
c) 8 mamas saudáveis pertencentes ao Grupo 2;
d) 14 mamas saudáveis pertencentes ao Grupo 3;
e) 10 mamas saudáveis pertencentes ao Grupo 4.

As amostras foram descongeladas em banho-maria em temperatura ambiente. Para o preparo da amostra e análise utilizou-se o método descrito por Tang et al. (2012) adaptado. As amostras de colostro foram agitadas em vortex por 1 minuto para homogeneização. Devido ao alto percentual de gordura presente no colostro das ovelhas, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada amostra e diluída com água de Milli-Q (1:5 v/v). Após nova agitação em vortex por 1 minuto, foram adicionados 8 mL de acetonitrila, 400 mg de $MgSO_4$ e 100 mg de NaCl. A solução hipersaturada foi novamente agitada em vortex por 1 minuto e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante, o qual foi seco em N_2 a 45ºC em banho-maria, sendo o resíduo reconstituído em 0,5 mL tampão bifosfato utilizado como fase móvel, filtrado e injetado no cromatógrafo.

4.10. Análise Estatística

Na análise dos dados, utilizou-se o pacote estatístico SAS (2002/2003). O teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram empregados para estudar as distribuições de frequência dos casos de mastite nos grupos testados, as taxas de curas entre os grupos experimentais (G1, G2 e G3) e a evolução para mastite em glândulas saudáveis (G1, G2, G3 e G4). Para comparação da pré-disposição de um lado da mama em desenvolver mastite, utilizou-se o teste de Qui-quadrado de Aderência. Os valores significativos de qui-quadrado que estiveram próximos aos valores tabelados foram ajustados de acordo com a correção de continuidade de Yates (SAMPAIO, 1998).

Para comparações das médias de contagem de células somáticas utilizou-se o teste t Student. Os valores da CCS foram transformados em valores logarítmicos, já que os dados não apresentaram distribuição normal. Os resultados do CMT e da CCS foram submetidos à avaliação de concordância pelo método KAPPA, cujos valores foram interpretados como segue: < 0,00 – ruim; entre 0,00 e 0,20 – fraca; entre 0,21 e 0,40 – sofrível; entre 0,41 e 0,60 – regular; entre 0,61 e 0,80 – boa; entre 0,81 e 0,99 – ótima; e 1,00 – perfeita (PEREIRA, 2002).

De acordo com as taxas de sensibilidade e especificidade mais adequadas, foi definido o ponto ideal de corte para a CCS por meio da análise da curva TG-ROC (*Two-graph receiver operating characteristic*) (PEREIRA, 2002), a qual foi calculada pela ferramenta on-line disponibilizada pela *AusVet Animal Health Services* (2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo as matrizes apresentaram em média intervalo entre partos de 260 dias. As prevalências da mastite subclínica nos animais nas diversas estações de parições do rebanho variaram de 20,8% a 41,2%. Das 207 ovelhas avaliadas, 70 (33,8%) apresentaram mastite subclínica em pelo menos uma das mamas. As ocorrências de animais positivos para mastite infecciosa na raça Santa Inês foi de 33,1% (43 animais) e de 35,6% (27 animais) nas ovelhas da raça Morada Nova. As duas raças de ovelhas estudadas não apresentaram diferença na susceptibilidade em desenvolver mastite (P = 0,77; RR = 0,94) quando foram submetidas ao mesmo manejo. As ocorrências dos agentes etiológicos nas infecções mamárias subclínicas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Ocorrência de agentes etiológicos em infecções mamárias puras ou mistas em ovelhas de aptidão para produção de carne.

	Ocorrência					
	Mamas de ovelhas SI[1]		Mamas de ovelhas MN[2]		Total das mamas	
Micro-organismos	N	%	N	%	N	%
SCN[3]	23	46,9	16	57,1	39	50,6
Enterobactérias	11	22,5	4	14,3	15	19,5
Streptococcus spp.	6	12,3	1	3,6	7	9,1
Micrococcus spp.	3	6,1	2	7,15	5	6,5
Staphylococcus aureus	1	2,0	3	10,7	4	5,2
Corynebacterium spp.	2	4,1	2	7,15	4	5,2
Streptococcus spp. + SCN	2	4,1	0	0,0	2	2,6
SCP[4]	1	2,0	0	0,0	1	1,3
Total	49	100,0	28	100,0	77	100,0

[1]SI: Ovelhas da raça Santa Inês; [2]MN: Ovelhas da raça Morada Nova; [3]SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativos; [4]SCP: *Staphylococcus* coagulase-positivos.

Foram examinadas neste estudo 393 mamas. Dessas, 77 (19,6%) foram positivas para mastite subclínica infecciosa. As ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova apresentaram o mesmo percentual de mamas com mastites

subclínicas (19,6% das mamas avaliadas das raças). A ausência de estrados nos locais onde os animais se abrigavam associada à contaminação do ambiente por fezes pode ter propiciado um constante desafio às defesas do aparelho mamário ovino e favorecido o surgimento dos casos de mastite subclínica. Esse resultado foi inferior à ocorrência de mamas com mastites subclínicas obtida por Morais et al. (2011) (58,7%), semelhante às encontradas por Guaraná et al. (2011) (ocorrências entre 23,53% a 35,29%) e superior à encontrada por Silva et al. (2010) (7,4%).

Das mamas com infecções subclínicas, 44 (57,1%) estavam presentes na metade direita e 33 (42,9%) na esquerda. Apesar da diferença percentual verificada, não houve diferença significante (P = 0,21) quanto à susceptibilidade de uma metade mamária em desenvolver mastite subclínica. Discordando desse resultado, Guaraná et al. (2011) observaram maior ocorrência das infecções subclínicas (80,0%) comprometendo a metade mamária direita e levantaram a possibilidade de estar relacionada ao hábito da ovelha deitar-se sobre a glândula mamária direita durante a ruminação, expondo-a à maior contaminação ambiental. Este hábito não foi investigado no presente estudo.

Os SCN foram os agentes etiológicos predominantes nas infecções mamárias observadas neste estudo. Estes micro-organismos foram responsáveis por infecções em 39 (50,6%) mamas. Corroborando com este resultado, Domingues et al. (2006), Silva et al. (2010) e Guaraná et al. (2011) constataram a presença dos SCN na maioria das infecções subclínicas em mamas de ovelhas de corte com ocorrências de 67,9%, 26,9% e 65,9% dos casos encontrados, respectivamente.

No presente estudo, os micro-organismos pertencentes ao grupo das enterobactérias foram isolados com a segunda maior ocorrência (15 mamas; 19,5% das infecções) em mastites subclínicas de ovelhas com aptidão para produção de carne. O elevado percentual de mamas infectadas com enterobactérias denota a importância desses agentes na patogenia da doença e ratifica a importância da adoção de medidas higiênicas nas instalações onde são manejadas ovelhas em lactação, a exemplo da remoção diária de dejetos. Discordando dos resultados observados neste estudo, Silva et al. (2010) e

Coutinho et al. (2006) posicionaram *S. aureus* como segundo agente etiológico bacteriano de maior importância, presente em 15,4% e 15,2% dos casos de mastites subclínicas infecciosas, respectivamente.

Nas infecções mamárias subclínicas observadas nos animais amostrados, houve a associação apenas entre *Staphylococcus* coagulase-negativos e *Streptococcus* spp., que estiveram presentes em duas (4,1%) mamas de ovelhas da raça Santa Inês, não sendo observadas infecções mistas em ovelhas da raça Morada Nova. Domingues et al. (2006) verificaram que as associações de micro-organismos mais frequentes foram de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (33,4%), e de *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (28,6%).

Os métodos diagnósticos empregados para triagem da mastite subclínica em ovelhas de aptidão para produção de carne apresentaram as seguintes sensibilidades e especificidades, demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos pontos de cortes dos métodos diagnósticos da mastite subclínica de ovelhas de corte utilizados na secagem.

Métodos diagnósticos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
CMT[1] (1+)	77,4	78,3
CMT (2+)	56,0	95,5
CMT (3+)	39,3	97,7
CCS[2] > 100 x 10^3	92,5	36,9
CCS > 200 x 10^3	86,6	63,5
CCS > 250 x 10^3	83,6	68,8
CCS > 300 x 10^3	77,6	74,5
CCS > 400 x 10^3	73,1	80,5
CCS > 500 x 10^3	68,7	85,5

[1]CMT: *California Mastits Test*; (1+), (2+) ou (3+) = Intensidade da reação positiva no CMT; [2]CCS: Contagem de células somáticas/ mL de leite.

O ponto de corte de 1+ no exame de CMT apresentou especificidade de 78,3% e maior sensibilidade quando comparado aos graus de reação 2+ e 3+. A fim de direcionar o tratamento da ovelha seca com o objetivo de reduzir as perdas econômicas decorrentes da mastite ovina, é importante que o método de triagem não apresente baixa sensibilidade. Pontos de corte com menores

sensibilidades podem acarretar em um número maior de animais realmente infectados não submetidos ao tratamento, sobretudo quando acometidos por patógenos relacionados com menor aumento do número de células somáticas. Segundo Lafi (2006), o teste de triagem ideal deve ter a máxima sensibilidade para minimizar os resultados falso-negativos e que os resultados falso-positivos podem ser identificados com o uso conjunto do exame microbiológico.

Com os resultados de sensibilidade e especificidade observados neste estudo, a reação 1+ mostrou-se ideal a ser empregada na triagem de animais destinados ao tratamento à secagem com antimicrobiano, principalmente se o produtor optar somente pelo uso do CMT e quando a ocorrência de mastite subclínica for semelhante à encontrada nos animais do rebanho estudado. No entanto, tornam-se necessários mais estudos relacionando o custo, a eficácia dos tratamentos e a resistência antimicrobiana frente ao princípio ativo utilizado. Nunes et al. (2008) também elegeram a reação 1+ no CMT como ideal para diferenciação das glândulas mamárias de ovelhas Santa Inês entre saudáveis e acometidas com mastite subclínica.

No valor limite da CCS utilizado no presente estudo (250 x 10^3 células/ mL de leite) para a triagem da mastite subclínica no momento da secagem, foi observada sensibilidade de 83,6%, a qual foi superior à sensibilidade de todo os graus de reações do CMT observados. O uso conjunto com o exame microbiológico reduz a possibilidade de resultados falso-positivos decorrente da menor especificidade (68,8%) verificada para este valor de corte quando comparado aos valores limiares superiores de CCS e às especificidades observadas nos diferentes graus de reações de CMT.

O ponto de corte ideal para diagnóstico indireto da mastite subclínica utilizando somente a CCS no momento da secagem das ovelhas observado neste estudo foi de 388 x 10^3 células/ mL de leite (sensibilidade de 77,3% e especificidade de 79,4%) (Figura 6). O ponto de corte obtido nesse estudo representa quase o dobro do valor limiar já consagrado para diagnóstico indireto da mastite subclínica bovina (200 x 10^3 células/ mL de leite), ratificando a diferença fisiológica entre as mamas das espécies.

A padronização de um ponto de corte da CCS específico para ovelhas de corte apresenta grande importância diante da falta de consenso entre

pequisadores. O valor de 388 x 10^3 células/ mL de leite obtido neste estudo é inferior ao recomendado por Nunes et al. (2008) (500 x 10^3 células/ mL de leite), que coletaram amostras de leite de 390 glândulas mamárias de ovelhas da raça Santa Inês e compararam valores preditivos de três pontos de corte (300, 500 e 1.000 x 10^3 células/ mL de leite). Porém, a sensibilidade encontrada neste trabalho foi semelhante e a especificidade foi superior aos percentuais encontrados para o valor de corte sugerido por Nunes et al. (2008) (sensibilidade de 77,5% e especificidade de 69,2%).

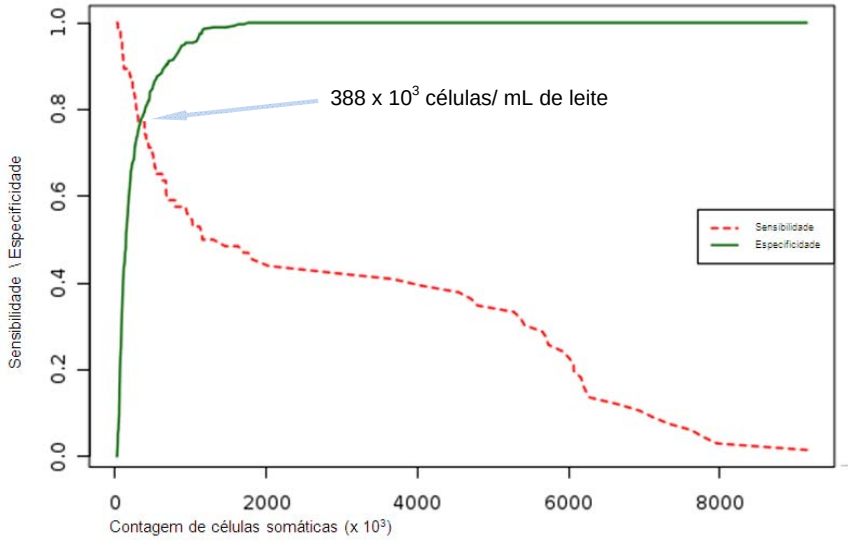


Figura 6. Curva TG-ROC (*Two-graph receiver operating characteristic*) da relação dos exames de CCS e microbiológico.

O valor encontrado neste trabalho (388 x 10^3 células/ mL de leite) apresentou sensibilidade e especificidade superiores quando comparado ao valor sugerido por Clements et al. (2003). Esses autores realizaram exames microbiológicos e CCS em 195 amostras de glândulas clinicamente normais de ovelhas de aptidão para produção de carne e, por meio da análise da curva TG-ROC, sugeriram o valor de corte de 1.200 x 10^3 células/ mL de leite (sensibilidade de 72% e especificidade de 63%).

As concordâncias entre os graus de reações do CMT e os valores de CCS encontradas neste trabalho por meio da análise de Kappa estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Índices de concordâncias (Kappa – k) entre pontos de corte de CMT e de CCS.

	Valores de CCS[1] x 10^3 células/ mL de leite					
	CCS > 100	CCS > 200	CCS > 250	CCS > 300	CCS > 400	CCS > 500
CMT[2] (1+)	0,31	0,59	0,63	0,68	0,71	0,67
CMT (2+)	0,13	0,30	0,35	0,43	0,51	0,61
CMT (3+)	0,08	0,19	0,23	0,21	0,34	0,42

[1]CCS: Contagem de células somáticas; [2]CMT: *California Mastits Test;* (1+), (2+) ou (3+) = Intensidade da reação positiva no CMT.

Não se constatou concordância perfeita ou ótima entre os métodos diagnósticos nos pontos de corte analisados. A reação de 1+ no CMT apresentou boa concordância com os valores superiores a 250 x 10^3 células/ mL de leite na CCS, porém apresentou menor linearidade (R^2 = 0,64) com os valores de CCS quando comparado às reações 2+ (R^2 = 0,97) e 3+ (R^2 = 0,91).

As maiores concordâncias foram observadas entre o CMT 1+ e os valores situados entre 300 e 500 x 10^3 células/ mL de leite na CCS. Em pontos de corte inferiores a 250 x 10^3 células/ mL de leite, as concordâncias foram classificadas como regular ou sofrível a depender do grau de reação no CMT. A maior concordância (k = 0,71) foi observada entre o CMT 1+ e a CCS superior à 400 x 10^3 células/ mL (valor próximo ao observado na análise por meio da curva TG-ROC), o que fortalece o uso desses dois pontos de corte no diagnóstico indireto da mastite subclínica de ovelhas de corte.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes às contagens de células somáticas das mamas infectadas e não infectadas, antes da secagem das ovelhas, ou seja, anteriormente ao tratamento.

Tabela 4. Contagens de células somáticas (células/ mL de leite x 10^3) antes da secagem das mamas nos diferentes grupos experimentais.

	Contagem de células somáticas[1]	
Grupos	Mamas infectadas	Mamas sadias
G1	3.594[a]	111[c]
G2	1.172[b]	148[c]
G3	741[b]	98[c]
G4	*	98[c]
Geral	1.566	111

[1]Médias geométricas; G1: Grupo Controle; G2: Mamas tratadas com cloxacilina convencional (100 mg/ 10 mL); G3: Mamas tratadas com cloxacilina nanoencapsulada (50 mg/ 86 mL); G4: Mamas tratadas com cloxacilina nanoencapsulada (100 mg/ 172 mL); *As mamas do G4 eram todas sadias antes da secagem; Valores com letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa (P < 0,05).

O número de células somáticas está associado à situação bacteriológica da glândula mamária ovina (McDOUGALL et al., 2001). Assim, de maneira similar ao presente estudo, Leitner et al. (2003) observaram médias geométricas altas (2,1 x 10^6 células/ mL de leite) em glândulas mamárias infectadas. Entre as mamas infectadas, a CCS média mais alta no momento da secagem foi encontrada no grupo de ovelhas não submetidas ao tratamento; em todos os grupos as mamas infectadas apresentaram médias superiores (P < 0,05) às mamas saudáveis. As médias geométricas de CCS das glândulas mamárias consideradas saudáveis de todos os grupos foram semelhantes à média observada de culturas bacteriológicas negativas por Riggio et al. (2013) (135 x 10^3 células/ mL de leite) em ovelhas leiteiras.

Após a triagem dos animais com mastite subclínica e os tratamentos, oito ovelhas (duas do G1, duas do G2 e quatro do G3) não apresentaram prenhez positiva, duas ovelhas (uma do G1 e uma do G3) abortaram e três ovelhas (duas do G1 e uma do G3) vieram a óbito, impossibilitando suas avaliações. As mamas dos animais consideradas infectadas e avaliadas após os tratamentos foram distribuídas nos grupos experimentais conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das glândulas mamárias com mastite subclínica nos grupos experimentais de acordo com os micro-organismos isolados.

	Grupos experimentais					
	G1		G2		G3	
Micro-organismos	N	%	N	%	N	%
SCN[1]	3	14,3	15	71,4	15	75,0
Enterobactérias	12	57,0	0	0,0	0	0,0
Streptococcus spp.	3	14,3	1	4,8	0	0,0
Staphylococcus aureus	1	4,8	1	4,8	1	5,0
Corynebacterium spp.	0	0,0	0	0,0	2	10,0
Streptococcus spp. + SCN	1	4,8	1	4,8	0	0,0
Micrococcus spp.	1	4,8	3	14,2	1	5,0
SCP[2]	0	0,0	0	0,0	1	5,0
Total	21	100,0	21	100,0	20	100,0

[1]SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativos; [2]SCP: *Staphylococcus* coagulase-positivos; G1: Grupo Controle; G2: Infusão de antimicrobiano convencional; G3: Infusão de antimicrobiano nanoencapsulado.

A avaliação da capacidade de cura da mastite subclínica ovina por meio dos tratamentos empregados no momento da secagem está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Taxas de cura* obtidas para mamas de ovelhas nos grupos testados.

	Mamas Curadas		Mamas não curadas		Total	
Grupos	N	%	N	%	N	%
G1	4	19,0[a]	17	81,0[c]	21	33,9
G2	4	19,0[a]	17	81,0[c]	21	33,9
G3	10	50,0[b]	10	50,0[d]	20	32,2
Total	18	29,0	44	71,0	62	100,0

*Cura: Ausência de isolamentos microbiológicos em conjunto com CCS inferior a 250 x 10^3 células/ mL de leite e CMT negativo; G1: Grupo Controle; G2: Mamas tratadas com cloxacilina convencional (concentração de 100 mg/ 10 mL); G3: Mamas tratadas com cloxacilina nanoencapsulada (concentração de 50 mg/ 86 mL); Valores com letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem à diferença significativa ($P < 0,05$).

O emprego de antimicrobiano nanoencapsulado para tratamento e prevenção da mastite subclínica em ovelhas de corte realizado neste trabalho é pioneiro, não havendo ensaios clínicos similares até o presente momento. A cloxacilina benzatina nanoencapsulada mostrou-se mais eficiente na cura da

mastite subclínica ovina, mesmo quando empregada na metade da dose utilizada deste antimicrobiano no estado livre. A taxa de cura no grupo de tratamento com antimicrobiano nanoencapsulado na concentração de 50 mg/ 86mL (Grupo 3) foi superior (P = 0,0429) às taxas de cura nos outros grupos.

O processo de nanoencapsulação descrito neste trabalho foi capaz de melhorar a eficácia da cloxacilina benzatina contra infecções mamárias causadas por bactérias e reduzir a quantidade utilizada desse princípio ativo. A utilização de baixas concentrações, que sejam eficazes, se faz necessária à medida que os antibióticos podem desencadear morte celular quando a concentração extracelular atinge níveis suficientemente elevados e o tempo de exposição é muito prolongado (BARCIA-MACAY et al., 2006).

Na escassez de ensaios *in vivo*, diversos autores têm relatado resultados de testes *in vitro* comparando antimicrobianos nanoencapsulados e sua forma livre. Toti et al. (2011) verificaram que a nanoencapsulação da azitromicina e da rifampicina utilizando polímeros biodegradáveis causou aumento das concentrações dos antimicrobianos no espaço intracelular que, em combinação com o processo de liberação prolongada, pode ser responsável pela maior eficácia no sítio de infecção da *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*, quando comparados a esses fármacos em estado livre.

Segundo Barcia-Macay et al. (2006), os efeitos dos antibióticos são dependentes da concentração e do tempo de exposição, porém as atividades intracelulares normalmente permanecem inferiores às extracelulares.

Aumentar somente o acúmulo intracelular pode não ser o principal fator de sucesso da terapia antimicrobiana. Imbuluzqueta et al. (2012) estudaram o efeito da gentamicina *in vitro* em células infectadas por *Listeria monocytogenes* e *S. aureus*. Esses autores sugeriram que a atividade bactericida deste fármaco pode ser até 10 vezes menor no espaço intracelular quando comparada à atividade no espaço extracelular. Os resultados encontrados indicaram que as nanocápsulas de gentamicina permitem acumular a droga em níveis mais elevados dentro das células e serem também distribuídas nos compartimentos lisossomal e citosólico, o que resulta em uma atividade intracelular melhorada contra bactérias intracelulares que prosperam no

citossol, tais como *L. monocytogenes*, e aquelas que prosperam nos lisossomos, tais como *S. aureus*.

Kisich et al. (2007) observaram que a encapsulação da moxifloxacina em nanopartículas biodegradáveis aumenta a eficácia contra *Mycobacterium tuberculosis* residente em macrófagos humanos ao se acumularem três vezes mais no espaço intracelular que a droga livre e sendo capaz de inibir a multiplicação desse micro-organismo mesmo quando utilizada uma concentração 10 vezes menor.

A eficiência de 87% do processo de encapsulação da cloxacilina benzatina utilizada neste trabalho faz com que haja um percentual da droga em forma livre capaz de iniciar rapidamente o combate aos micro-organismos mais expostos. O percentual do antimicrobiano em nanocápsulas promove penetração mais eficiente nos locais de infecção menos acessíveis à forma livre do fármaco como o ambiente intracelular dos macrófagos e possui o princípio ativo protegido da degradação precoce ocasionando a liberação prolongada.

O tratamento com antimicrobiano em formulação convencional na concentração de 100 mg/ 10mL (Grupo 2) apresentou o mesmo percentual de cura observado para o Grupo Controle neste trabalho, não devendo ser recomendado para uso no momento da secagem de ovelhas por não compensar o maior uso de mão de obra para o manejo dos animais e, consequentemente, gerar maiores custos. Chaffer et al. (2003) estudaram a eficácia do tratamento com antimicrobiano em forma livre no período seco em ovelhas leiteiras. Para tanto, administraram via intramamária uma dose confeccionada para uso em glândula bovina composta por benzilpenicilina (300 mg), nafcilina (109,65 mg) e dihidroestreptomicina (125 mg). Os autores observaram taxas de cura de 64,9% e 6,5% para os grupos tratamento e controle, respectivamente.

O percentual de cura do grupo tratamento observado por Chaffer et al. (2003) é superior aos encontrados no presente estudo, quando comparado aos grupos que utilizaram 100 mg cloxacilina benzatina em forma livre (19,0%) e 50 mg de cloxacilina benzatina nanoencapsulada (50,0%). No entanto, as dosagens administradas via intramamária nesse trabalho correspondem,

respectivamente, a 1/6 e 1/12 da dosagem dos antimicrobianos produzidos com este princípio ativo que estão disponíveis comercialmente para uso em vacas no momento da secagem.

Das mamas não curadas dos animais experimentais, quatro (23,5%) do Grupo Controle, três (17,6%) do Grupo 2 e uma (10%) do Grupo 3 evoluíram para mastite clínica na lactação subsequente (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Mama de ovelha da raça Santa Inês com mastite clínica na parição pós-tratamento.



Figura 8. Mama de ovelha da raça Morada Nova com mastite clínica na parição pós-tratamento.

O processo inflamatório na glândula mamária desencadeado em resposta a um micro-organismo invasor pode ser efetivo no combate à infecção e a mama ovina pode apresentar auto-cura. A taxa de cura espontânea observada nas mamas com mastite subclínica no Grupo Controle foi de 19% (quatro glândulas mamárias), sendo três mamas infectadas por enterobactérias. O resultado é semelhante ao percentual de 21% observado por Kirk, Glenn e Maas (1996) e superior ao 6,5% de Chaffer et al. (2003).

A ocorrência de mastite subclínica após os tratamentos nas mamas consideradas saudáveis no momento da secagem dos animais dos grupos experimentais está representado na Tabela 7.

Tabela 7. Evolução da mastite subclínica em mamas saudáveis após serem submetidas aos tratamentos experimentais.

	Mamas sadias[1]		Mamas infectadas[2]		Total	
Grupos	N	%	N	%	N	%
G1	2	28,6[a]	5	71,4[c]	7	18,0
G2	4	50,0[a]	4	50,0[c]	8	20,5
G3	10	71,4[a]	4	28,6[c]	14	35,9
G4	7	70,0[a]	3	30,0[c]	10	25,6
Total	23	59,0	16	41,0	39	100,0

[1]Mamas que permaneceram sadias após os tratamentos; [2]Mamas infectadas após os tratamentos; G1: Grupo Controle; G2: Mamas tratadas com cloxacilina convencional (100 mg/ 10 mL); G3: Mamas tratadas com cloxacilina nanoencapsulada (50 mg/ 86 mL); G4: Mamas tratadas com cloxacilina nanoencapsulada (100 mg/ 172 mL); Valores com letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem à diferença significativa ($P < 0,05$).

Os grupos que receberam tratamentos com antimicrobiano nanoencapsulado (G3 e G4) apresentaram elevada diferença aparente quando visualizados os percentuais contidos na Tabela anterior, sobretudo quando comparados ao grupo Controle. No entanto, não houve diferenças significantes entre o G1 e o G3 ($P = 0,1588$) e o G1 e G4 ($P = 0,1534$) quanto à capacidade de prevenção de novas infecções. O baixo número de mamas distribuídas nos grupos pode ter influenciado na ausência de diferença estatística, embora haja uma tendência observável. O período seco muito longo das ovelhas com aptidão para corte pode contribuir para redução da capacidade preventiva do uso de antimicrobianos, embora a fase inicial da involução mamária seja o momento de maior risco para a ocorrência de infecções. Não foi objeto desse estudo, porém o uso de um selante de teto adaptado à espécie ovina, associado ao tratamento à secagem, talvez possa reduzir a influência do longo período seco e aumentar a eficiência dos tratamentos na prevenção de novos casos de mastite subclínica.

Não houve diferença quanto ao surgimento de infecções mamárias nos diferentes grupos experimentais após os tratamentos, demonstrando que a administração de fârmacos via intramamária respeitando os princípios de antissepsia é um procedimento seguro para manutenção da saúde da glândula

mamária ovina e não se mostra como um fator facilitador para invasão do úbere por bactérias colonizadoras do esfíncter do teto.

A Tabela 8 apresenta resultados referentes à evolução da CCS na lactação seguinte, após o período seco das ovelhas.

Tabela 8. Evolução do número de células somáticas das mamas infectadas quando comparadas as duas lactações, antes da secagem e após a parição, de acordo com o grupo experimental.

	Manutenção do número de células somáticas > 250 x 10^3/ mL	Redução do número de células somáticas para limites normais (< 250 x 10^3/ mL)
Grupos	N de mamas	N de mamas
G1	14^a	4^c
G2	13^a	4^c
G3	9^a	10^c
Total	36	18

G1: Grupo Controle; G2: Animais tratados com cloxacilina convencional; G3: Animais tratados com cloxacilina nanoencapsulada; Valores com letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem à diferença significativa (P < 0,05).

Não houve diferença (P = 0,0855) entre os grupos (G1, G2 e G3) quanto à capacidade de redução da CCS de mamas infectadas ao nível considerado normal, apesar do grupo em que foi administrado o antimicrobiano nanoencapsulado ter reduzido um número maior de glândulas mamárias. O menor número de dados analisados deve-se ao fato de que a CCS não foi o único critério para avaliar o quadro inflamatório. Quando não foi possível a obtenção da amostra para o exame devido ao pequeno volume de leite presente, o CMT foi considerado para classificar o quadro inflamatório. Os valores médios de células somáticas presentes em amostras de leite de acordo os micro-organismos isolados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Médias de CCS relacionadas aos micro-organismos isolados em mamas ovinas.

Micro-organismos	CCS[1] x 10^3	N de mamas com isolamento
Enterobactérias	3.194[a]	23
SCN + *Streptococcus* spp.	1.853[ab]	2
Staphylococcus aureus	1.827[ab]	14
Streptococcus spp.	1.728[ab]	12
Micrococcus spp.	1.504[ab]	4
SCN	1.412[ab]	80
Corynebacterium spp.	348[b]	5
Geral	1.456	140

[1]Médias geométricas das contagens de células somáticas; SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativos; Valores com letras diferentes correspondem à diferença significativa (P < 0,05).

Exceto *Corynebacterium* spp., os demais micro-organimos induziram reações inflamatórias expressas por contagens de células somáticas acima de 1.400 x 10^3 células/ mL de leite. Apesar da diferença visual do número de células somáticas associado ao isolamento de enterobactérias quando comparado com o isolamento dos demais micro-organimos, houve diferença (P < 0,05) apenas entre enterobactérias e *Corynebacterium* spp. Concordando com os resultados deste estudo, Leitner et al. (2003) e Ariznabarreta, Gonzalo e San Primitivo (2002) verificaram que *Corynebacterium* spp. são capazes de induzir moderadas reações inflamatórias, observando médias geométricas de CCS inferiores a 500 x 10^3 células/ mL de leite. Gonzalo et al. (2002) também observaram uma baixa média geométrica da CCS (187 x 10^3 células/ mL de leite) associada a infecções causadas por *Corynebacterium* spp. e uma média de 949 x 10^3 células/ mL de leite associada às infecções causadas por enterobactérias em metades mamárias de ovelhas leiteiras.

De maneira similar ao presente estudo, Leitner et al (2001) também observaram uma resposta celular elevada das glândulas mamárias de ovelhas leiteiras no final da lactação quando infectadas por SCN (2.129 x 10^3 células/ mL de leite) e sugeriram que a mama ovina possui uma resistência menor e uma resposta imunológica mais elevada a estas bactérias do que a glândula mamária bovina.

A média de CCS verificada nas mamas infectadas por *Micrococcus* spp. neste trabalho foi superior à observada por Gonzalo et al. (2002) (114 x 10^3 células/ mL de leite), porém pode ter sido influenciado pelo pequeno número de isolamentos deste micro-organismo.

O cateter utilizado para a infusão intramamária do fármaco mostrou-se adaptado à anatomia do teto ovino, não desencadeando lesões visíveis aos esfíncteres e permitindo uma adequada velocidade de passagem do medicamento. Tal adaptação associada à antissepsia do procedimento tem sua importância realçada por Mota (2008) quando enfatiza que o principal risco de infecção é determinado pelos micro-organismos que colonizam o óstio do teto, assim como pelas operações que favorecem a invasão destes pelo canal do teto. Danos causados às barreiras de proteção da glândula mamária (esfíncter e estruturas protéicas do canal do teto), que dificultam a invasão de micro-organismos, pela introdução de dispositivos de grandes dimenções podem favorecer a infecção no momento da secagem.

Não houve presença de edema no úbere dos animais de ambos os grupos, antes e depois do tratamento. Durante a aplicação, não houve sinais de dor intensa local em nenhum dos animais submetidos aos tratamentos. Uma possível sensibilidade desencadeada pelo aumento da pressão intramamária, sobretudo nos animais que receberam infusão de volume de 172 mL pode ter sido amenizada pela temperatura (5-8ºC) do produto.

Uma hora após a infusão, as mamas e os tetos dos animais submetidos aos tratamentos com antimicrobianos nanoencapsulados mostraram-se extremamente dilatados. Uma leve massagem nas extremidades dos tetos facilitou que os esfíncteres permanecessem fechados embora com baixa tonicidade devido à pressão exacerbada intramamária. Não houve sinais clínicos de reação inflamatória após aplicação do medicamento (Figura 9).



Figura 9. Úbere ovino 24 horas após infusão intramamária de antimicrobiano nanoencapsulado.

O elevado volume do antimicrobiano nanoencapsulado administrado pode ter facilitado casos de reinfecção ou de infecção de mamas inicialmente sadias devido à provável facilitação da entrada de micro-organismos. No entanto, o volume utilizado nesse trabalho também pode ter atuado facilitando a penetração do antimicrobiano na glândula mamária, já que a cisterna do teto possui pequena dimensão e foi constatada uma visível dilatação da glândula mamária durante a infusão. A redução do volume sem que haja alteração da eficácia do fármaco é fundamental para facilitar o manejo da aplicação intramamária e se mostra como fator essencial para a sua aceitação pelo produtor, sendo um assunto que deve ser mais estudado para o desenvolvimento de medicamentos intramamários contra mastite para espécie ovina.

A metodologia desenvolvida para detecção de resíduos de cloxacilina em colostro ovino por meio da CLAE foi aplicada em 68 amostras. Em nenhuma amostra foi detectado resíduo de cloxacilina a partir do limite de quantificação da técnica de 1,0 mg/ L, como ilustrado pelo cromatograma de uma das amostras (Figura 10).

Chaffer et al. (2003) detectaram a presença de resíduo antimicrobiano até o quarto dia pós-parto ao secarem as ovelhas leiteiras 50 dias antes de parir. No entanto, o intervalo entre a secagem e o parto subsequente em ovelhas de corte normalmente é longo. Nos animais estudados, o intervalo

médio entre os tratamentos experimentais no momento da secagem e o parto subsequente foi de 152 dias, e associado à concentração reduzida dos fármacos empregados, foram fatores que não favoreceram a presença de resíduos antimicrobianos no colostro das ovelhas. Apesar de não ter sido detectada a cloxacilina no colostro ovino, a ausência na carne também deve ser constatada visando a segurança alimentar humana.

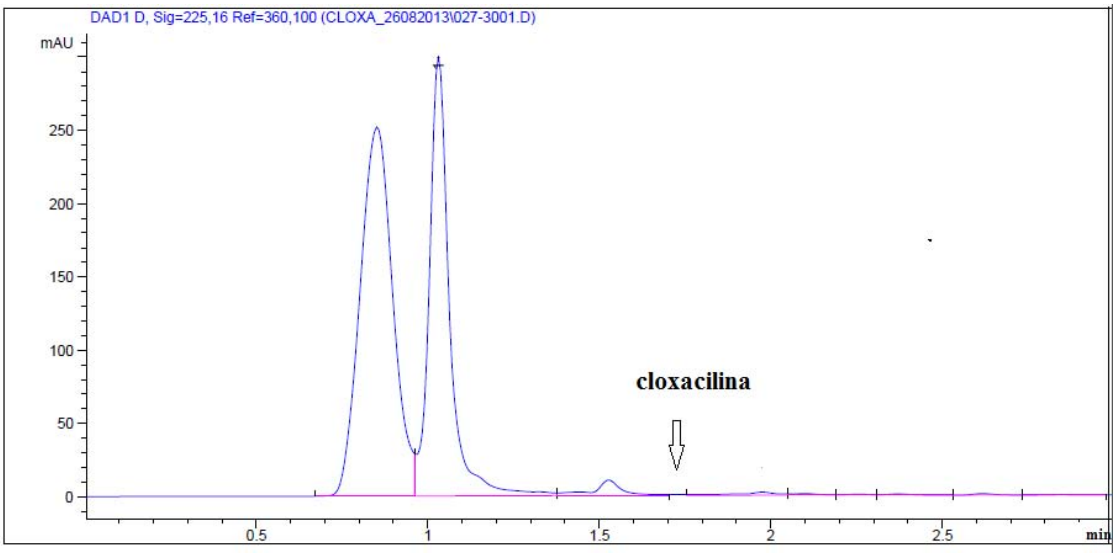


Figura 10: Cromatograma do extrato da amostra nº20 registrando a ausência de resíduo de cloxacilina.

6. CONCLUSÕES

- *Staphylococcus* coagulase-negativos foram os principais agentes causadores de mastite subclínica em ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova, seguidos pelas enterobactérias, o que reforça a maior prevalência de agentes contagiosos na ocorrência de mastite nesta espécie;

- Os exames de *California Mastits Test* e da contagem de células somáticas direcionam com sucesso o tratamento no período seco de infecções mamárias subclínicas, principalmente quando utilizados os pontos de cortes de 1+ ou de 388 x 10^3 células/ mL de leite, respectivamente, indicando que estes métodos indiretos podem ser utilizados para nortear o tratamento da ovelha seca;

- O uso da cloxacilina no momento da secagem de ovelhas de corte em estrutura nanoencapsulada e na concentração de 50 mg/ 86 mL foi eficiente para cura microbiológica de mastites subclínicas infecciosas, podendo ser indicados no tratamento de ovelhas na secagem;

- A cura da mastite subclínica de forma espontânea foi observada em ovelhas de aptidão para produção de carne, mas não em níveis que descartem esforços para a busca de métodos efetivos de controle para a doença;

- A administração dos antimicrobianos nas formulações e concentrações estudadas à secagem não influenciou na prevenção de casos de mastites pós-parto, mostrando baixa eficácia na profilaxia da mastite nas lactações subsequentes;

- Os tratamentos à secagem não proporcionaram resíduos de cloxacilina benzatina no colostro de ovelhas detectáveis acima do limite de quantificação de 1 mg/ L estabelecido pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com arranjos de diodos.

7. REFERÊNCIAS

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; RUGGIERI, D.; CILIBERTI, M.; SEVI, A. Immune competence of the mammary gland as affected by somatic cell and pathogenic bacteria in ewes with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3877-3887, 2012.

AL-MAJALI, A.; JAWABREH, S. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 243-248, 2003.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDERSON, R. R. Mammary gland growth sheep. **Journal of Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 118-123, 1975.

ANUALPEC 2013. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Informa economics FNP South America, 2013. 357 p.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet - Relatório 2006-2007** - **Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades)**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES, acesso em 11 de agosto de 2013.

ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. **Journal Dairy Science**, v. 85, n. 6, p.1370-1375, 2002.

ARSENAULT, J.; DUBREUIL, J.; HIGGINS, R.; BE´LANGER, D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 87, p. 373-393, 2008.

AUSVET ANIMAL HEALTH SERVICES. **Calculate test Sensitivity and Specificity and ROC curves**. Disponível em: http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=ROC_curves, acesso em 11 de novembro de 2013.

AZEVEDO, P. A.; SOUZA, A. G.;SANTOS, A. F.; SALES, T.;CHAGAS NETO, T.; PIGNATARI, A. C. Suscetibilidade à novobiocina na identificação de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) isolados de hemoculturas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 4, p. 303-304, 2007.

BAKER, J. S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 875-879, 1984.

BARCIA-MACAY, M.; SERAL, C.; MINGEOT-LECLERCQ, M.; TULKENS, P.M.; Van BAMBEKE. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activities of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Model of THP-1 Macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemother**, v. 50, n. 3, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

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

BERGONIER, D.; De CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, p. 689-716, 2003.

BERTHELOT, X.; LAGRIFFOUL, G.; CONCORDET, D.; BARILLET, F.; BERGONIER, D. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe Milk. **Small Ruminant Research**, v. 62, p. 27-31, 2006.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Corinebactérias; *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*; *Rhodococcus equi*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 119-126a.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Estafilococos. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 108-112b.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Estreptococos. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.113-118c.

BILENSOY, E.; GURKAYNAK, O.; DOĞAN, L. A.; HINCAL, A. A. Safety and efficacy of amphiphilic β-ciclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. **International Journal Pharmaceutics**, v. 347, p.163-170, 2008.

BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; NUNES, G. R.; SOUZA, F. N.; GOMES, V.; AZEDO, M. R.; SUCUPIRA, M. C. A.; MELVILLE, A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. D. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas da secreção mamária de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 137-142, 2010.

BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; SOUZA, F. N.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; STRICAGNOLO, C. R.; RICCIARDI, M.; GOMES, V.; AZEDO, M. R.; SANCHES, B. G. S.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. D. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 417-422, 2008.

BLAGITZ, M. G.; BENITES, N. R.; BATISTA, C. F.; SOUZA, F. N.; DIAS, R. A.; GOMES, V.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. D. Variações metodológicas na contagem de células somáticas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 668-671, 2013.

BLAGITZ, M. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; BATISTA, C. F.; BETIOL, P. S.; AZEDO, M. R.; GOMES, V.; SOUZA, F. N.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. D. Lactation stage and udder health status of Santa Ines ewes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 495-498, 2012.

BOGIALLI, S.; Di CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 947-966, 2009.

BURRIEL, A. R. Adhesion of coagulase-positive and coagulase-negative *staphylococci* to live ovine mammary epithelial cells. **Ruminant Research**, v. 31, p. 193-196, 1999.

BUSWELL, J. B.; BARBER, D. M. L. Antibiotic persistence and tolerance in the lactating sheep following a course of intramammary therapy. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 552-557, 1989.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.

CHAFFER, M.; LEITNER, G.; ZAMIR, S.; WINKLER, M.; GLICKMAN, A.; ZIV, N.; SARAN, A. Efficacy of dry-off treatment in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 11-16, 2003.

CHRISTLEY, R. M.; MORGAN, K. L.; PARKIN, T. D. H.; FRENCH, N. P. Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration in lambs in the UK. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, p. 209-226, 2003.

CIONE, A. P. P.; LIBERALE, M. J.; SILVA, P. M. Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de associações de ampicilinas em pó liofilizado para injeção. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 203-207, 2010.

CLEMENTES, A. C. A.; TAYLOR, D. J.; FITZPATRICK, J. L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 139-148, 2003.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement**, document M100-S22, v. 32, n. 3, p. 1-184. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>. Acesso em: 28 de setembro 2013.

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

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

CRAVEN, N. Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation: A review. **British Veterinary Journal**, v. 147, p. 410-422, 1987.

DOMINGUES, P. F.; LUCHEIS, S. B.; SERRÃO, L. S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A. P. A.; MARTINS, E. C. V.; LANGONI, H. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Ars Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 146-152, 2006.

DRESCHER, G.; MATTIELLO, S. P.; PEIXOTO, R. M.; VARGAS, A. C.; MACIEL, M. N.; COSTA, M. M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 188-193, 2010.

EUROPEAN COMISSION (2002) Commission Decision (EC) no 657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221/ 8, 2002. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF. Acesso em: 02 de novembro de 2013.

EUROPEAN COMISSION (1993). **Veterinary Medicinal Products Administered via the Teat Duct to Cows at Drying off for the Treatment of Subclinical Mastitis and Prevention of New Infections**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-7/a/7ae20a_en.pdf>. Acesso em: 02 de novembro de 2013.

FARIÑA, N.; SANABRIA, R.; FIGUEREDO, L.; RAMOS, L.; SAMUDIO, M. *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinário. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de La Salud**, v. 1, n. 1,p. 31-33, 2005.

FOLLY, M. M.; UÉBE, P. M.; TEIXEIRA, G. N.; LESSA, S. S. A.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Determinação de resíduos do antibiótico cloxacilina em leite de vacas com elevada contagem de células somáticas. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2008.

FRAGKOU, I. A.; GOUGOLIS, D. A.; BILLINIS, C.; MAVROGIANNI, V. S.; BUSHNELL, M. J.; CRIPPS, P. J.; TZORA, A.; FTHENAKIS, G. C. Transmission of *Mannheimia haemolytica* from the tonsils of lambs to the teat of ewes during sucking. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 66-74, 2011.

GEHRING, R.; SMITH, G. W. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 237-241, 2006.

GOLUBEVA, O. Y.; SHAMOVAB, O. V.; ORLOV, D. S.; PAZINA, T. Y.; BOLDINA, A .S.; DROZDOVA, I. A.; KOKRYAKOV, V. N. Synthesis and study of antimicrobial activity of bioconjugates of Silver nanoparticles and endogenous antibiotics. **Glass Physics and Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 78-84, 2011.

GOMES, V.; AMATO, A. L.; PONTE, G. C. T. G.; BLAGITZ, M.; MADUREIRA, K. M.; Della LIBERA, A. M. M. P. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e Verde de Metil Pironina-Y. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 162-167, 2010.

GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J. A.; SAM PRIMITIVO, F. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 1460-1467, 2002.

GREEN, T. J. Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. **Veterinary Record**, v. 114, p. 43, 1984.

GUARANÁ, E. L. S.; SANTOS, R. A.; CAMPOS, A. G. S. S.; SILVA, N. S. AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L. Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 851-858, 2011.

HADIMLI, H. H.; ERGANIS, O.; KAV, K.; SAYIN, Z. Evaluation of a combined vaccine against staphylococcal mastitis in ewes. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy***,* v. 49, p. 179-182, 2005.

HARIHARAN, H.; DONACHIE, W.; MACALDOWIE, C.; KEEFE, G. Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 188-192, 2004.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection**. 3.ed. Arlington, VA: National Mastitis Council, 1990.

HIRSH, D. C. Família Enterobacteriaceae. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 59-62.

HUNTLEY, S. J.; COOPER, S.; BRADLEY, J.; GREEN, L. A cohort study of the associations between udder conformation, milk somatic cell count, and lamb weight in suckler ewes. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 5001-5010, 2012.

IMBULUZQUETA, E.; LEMAIRE, S.; GAMAZO, C.; ELIZONDO, E.; VENTOSA, N.; VECIANA, J.; BAMBEZE, F.V.; BLANCO-PIETRO, M.J. Cellular pharmacokinetics and intracellular activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* of chemically modified and nanoencapsulated gentamicin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2158-2164, 2012.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGUEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v.180, n. 1-2, p. 1-25, 2011.

JAIN, A.; AGARWAL, A.; VERMA, R. K. Cefoxitin disc diffusion test for detection of meticillin-resistant staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 957-961, 2008.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Orgs.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006, p. 273-397.

KEISLER, D. H.; ANDREW, M. L.; MOFFAT, R. J. Subclinical mastitis in ewes and on its effect on lamb performance. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 1677-1681, 1992.

KIETZMANN, M.; NIEDORF, F.; GOSSELLIN, J. Tissue distribution of cloxacillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. **BMC Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1-5, 2010.

KIOSSIS, E.; BROZOS, C.N.; PAPAIANNOU, N.; TZANIDAKIS, N.; BOSCOS, C. Endoscopic and histopathological findings of teats in dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 70-75, 2009.

KIRK, J. H.; GLENN, J. S.; MAAS, J. P. Mastitis in a flock of milking sheep. **Small Ruminant Research**, v. 22, n. 2, p. 187-191, 1996.

KISICH, K.O.; GELPERINA, S.; HIGGINS, M.P.; WILSON, S.; SHIPULO, E.; OGANESYAN, E.; HEIFETS, L.; Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis.* **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 154-162, 2007.

KOBAYASHI, S. D.; BRAUGHTON, K. R.; PALAZZOLO-BALANCE, A. M.; KENNEDY, A. D; SAMPAIO, E.; KRISTOSTURYAN, E.; WHITNEY, A. R.; STURDEVANT, D. E.; DORWARD, D.W.; HOLLAND, S.M.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M.; DeLEO, F. R. Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus.* **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 560-575, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico microbiológico** – Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. Y. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B:** Biointerfaces, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LAFI, S. Q. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. **Small Ruminant Research**, v. 62, n. 1-2, p. 83-86, 2006.

LARSGARD, A. G; VAABENOE, A. Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 12, n. 3, p. 339-347, 1993.

LECÁROZ, C.; BLANCO-PIETRO, M. J.; BURRELL, M. A.; GAMAZO, C. Intracellular killing of Brucella melitensis in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 549-556, 2006.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of aoac International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LEITNER, G.; CHAFFER, M.; CARASO, Y.; EZRA, E.; KANANEA, D.; WINKLER, M.; GLICKMAN, A.; SARAN, A. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition fat, protein and lactose in Israeli-Assaf and Awassi sheep. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 157-164, 2003.

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

LEITNER, G.; CHAFFER, M.; ZAMIR, S.; MOR, T.; GLICKMAN, A.; WINKLER, M.; WEISBLIT, L.; SARAN, A. Udder disease aetiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. **Small Ruminant Research**, v. 39, p. 107-112, 2001.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MAROGNA, G.; ROLESU, S.; LOLLAI, S.; TOLA, S.; LEORI, G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 88, n. 2-3, p. 119-125, 2010.

MARTINS, R. F. S.; PAIM, T. P.; CARDOSO, C. A.; DALLAGO, B. S. L.; MELO, C. B.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C. Mastitis detection in sheep by infrared thermography. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 722-724, 2013.

MAVROGIANNI, V. S.; CRIPPS, P. J.; BROOKS, H.; TAITZOGLOU, I. A.; FTHENAKIS, G. C. Presence of subepithelial lymphoid nodules in the teat of ewes. **Journal of Veterinary Medicine Series C:** Anatomia, histologia, embryologia, v. 36, p. 168-171, 2007a.

MAVROGIANNI, V. S.; CRIPPS, P. J.; FTHENAKIS, G. C. Bacterial flora and risk of infection of the ovine teat duct and mammary gland throughout lactation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 79, p. 163-173, 2007b.

MAVROGIANNI, V.S.; CRIPPS, P.J.; PAPAIOANNOU, N.; TAITZOGLOU, I.; FTHENAKIS, G.C. Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. **Veterinary Research**, v. 37, n. 1, p. 89-105, 2006.

MAVROGIANNI, V. S.; MENZIES, P. I.; FRAGKOU, I. A.; FTHENAKIS, G. C. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America:** Food Animal Practice, v. 27, p. 115-120, 2011.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DENANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California Mastitis Test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 245-254, 2001.

MEDEIROS, A. N.; SILVA, T .M.; ALVES, A. R.; BEELEN, P. M. G. Inovações no manejo nutricional de ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 21., 2011, Alagoas. **Anais...** Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2011, p. 1-17.

MELO, C. B.; ALMEIDA, B. M.; OLIVEIRAS, A. A.; AZEVEDO, L. S. S.; MELO, L. S. S.; M; MATA, S. S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 1011-1013, 2008.

MEYER, A. M.; REED, J. J.; NEVILLE, T. L.; THORSON, J. F.; MADDOCK-CARLIN, K. R.; TAYLOR, J. B.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A.; LUTHER, J. S.; HAMMER, C. J.; VONNAHME, K. A.; CATON, J. S. Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1627-1639, 2011.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MORAIS, G.; ALMEIDA, A. C.; TEIXEIRA, L. M.; XAVIER, M. T. R.; SOUZA, R. M.; DUARTE, E. R. Caracterização da mastite ovina no norte de Minas Gerais: ocorrência, etiologia e epidemiologia. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 164-171, 2011.

MORK, T.; KVITLE, B.; JORGENSEN, H. J. Reservoirs of *Staphylococcus aureus* in meat sheep and dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, n. 155, p. 81-87, 2012.

MORONI, P.; CUCCURU, C. Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 1-7, 2001.

MORONI, P.; PISONI, G.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Effect of intramammary infection in Bergamasca meat sheep on milk parameters and lamb growth. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 340-344, 2007.

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

NACCARI, F.; MARTINO, D.; GIOFRÈ, F.; PASSANTINO, A.; DE MONTIS, P. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 1-9, 2003.

NMC (NATIONAL MASTITIS COUNCIL). **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Arlington, 1999.

NUNES. G. R.; BLAGITZ, M. G.; FREITAS, C. B.; SOUZA, F. N.; RICCIARDI, M.; STRICAGNOLO, C. R.; SANCHES, B. G. S.; AZEDO, M. R.; SUCUPIRA, M. C. A.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação de Indicadores Inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 271-278, 2008.

OLIVEIRA, J. A. M. Adoção de tecnologias recomendadas pela pesquisa para produção de caprino e de ovinos no estado da Bahia. **Revista Bahia Agrícola**, v. 2, n. 1, junho de 1996.

OMALEKI, L. BARBER, S. R.; ALLEN, J. L.; BROWNING, G. F. *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3419-3422, 2010.

PEIXOTO, R. M.; FRANÇA, C. A.; JÚNIOR, A.F.S.; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M.C. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.9, p.735-740, 2010a.

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

PENGOV, A.; KIRBIS, A. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 13-17, 2009.

PENGOV, A. The role of coagulase-negative *Sthaphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 572-574, 2001.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2002. 596p.

PETRIDIS, I.G.; MAVROGIANNI, V.S.; FRAGKOU, I.A.; GOUGOULI, D.A.; TZORA, A.; FOTOU, K.; SKOUFOS, I.; AMIRIDIS, G.S.; BROZOS, C.; FTHENAKIS, G.C. Effects of drying-off procedure of ewes' udder in subsequent mammary infection and development of mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 110, p. 128-132, 2013.

PREGO, C.; FABRE, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 549-556, 2006.

PRESCOTT, J.F. Quimioterapia antimicrobiana. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 27-42.

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

RATTRAY, P. V.; GARRETT, W. N.; EAST, N. E.; HINMAN, N. Growth, development and composition of the ovine conceptus and mammary gland during pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 613-626, 1974.

RIGGIO, V.; PESCE, L.L.; MORREALE, S.; PORTOLANO, B. Receiver-operating characteristic curves for somatic cell scores and California mastitis Test in Valle del Belice dairy sheep. **The Veterinary Journal**, v. 196, p. 528-532, 2013.

RIVAS, A. L.; SCHWAGER, S. J.; GONZÁLEZ, R. N.; QUIMBY, F. W.; ANDERSON, K.L. Multifactorial relationships between intramammary invasionby *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 135-144, 2007.

SAHA, B.; BHATTACHARYA, J.; MUKHERJEE, A.; GHOSH, A. K.; SANTRA, C. R.; DASGUPTA, A. K.; KARMAKAR, P. *In vitro* structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, p. 614-622, 2007.

SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, J.; LUENGO, C.; CORRALES, J. C.; FERNÁNDEZ, C. Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 71-77, 2003.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

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

SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; SIMÃO, L. C. V. Aspectos clínicos e das características físico-químicas do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007b.

SAS Institute. **Statistics Analyses Systems (SAS)**, versão 9.1.3. Cary, NC, USA, 2002/2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 5, n. 130, p. 199-207, 1957.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHARMA, N.; SINGH, N. K.; BHADWAL, M. S. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 3, p. 429-438, 2011.

SILVA, N. S.; SILVEIRA, F. A. S.; PINHEIRO, C. P.; SOUSA, M. G. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; MENDONÇA, C. L.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1043-1048, 2010.

SILVERSTEIN, S. C.; KABBASH, C. Penetration, retention, intracellular localization, and antimicrobial activity of antibiotics within phagocytes. **Current Opinion in Hematology**, v. 1, p. 85-91, 1994.

SMITH, G. W. Pharmacologic aspects of mastitis treatment. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 49.**,** 2010**,** Albuquerque**. Proceedings…** Albuquerque**:** NMC, 2010 p. 98-108, 2010.

SPANU, C.; BERGER, Y. M.; THOMAS, D. L.; RUEGG, P. L. Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 97, p. 139-145, 2011.

SWANSON, T. J.; HAMMER, C. J.; LUTHER, J. S.; CARLSON, D. B.; TAYLOR, J. B.; REDMER, D. A.; NEVILLE, T. L.; REED, J. J.; REYNOLDS, L. P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2415-2423, 2008.

TANG, Y. Y.; LU, H. F.; LIN, H. Y.; SHIH, Y. C.; HWANG, D. F. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 881-882, p. 12-19, 2012.

TATARCZUCH, L.; BISCHOF, R. J.; PHILIP, C. J.; LEE, C. S. Phagocytic capacity of leucocytes in sheep mammary secretions following weaning. **Journal of Anatomy**, v. 201**,** p. 351-361, 2002.

TATARCZUCH, L.; PHILIP, C. J.; BISCHOF, R. J.; LEE, C. S. Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep. **Journal of Anatomy**, v. 196, p. 313-326, 2000.

TIZARD, I. R. Os neutrófilos e seus produtos. In: _____. **Imunologia Veterinária**. 8.ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2009. p. 29-41.

TOTI, U.S.; GURU, B.R.; HALI, M.; McPHARLIN, C.M.; WYKES, S.M.; PANYAM, J.; WHITTUM-HUDSON, J.A. Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6606-6613, 2011.

VERÍSSIMO, C. J.; ZAFALON, L. F; OTSUK, I. P.; NASSAR, A. F. C. Prejuízos causados pela mastite em ovelhas Santa Inês. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 77, n. 4, p. 583-591, 2010.

WAAGE, S.; VATN, S. Individual animal risk factors for clinical mastitis in meat sheep in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 229-243, 2008.

WATSON, D.L.; BUSWELL, J.F. Modern aspects of sheep mastitis. **British Veterinary Journal**, v. 140, p. 529-534, 1984.

WHITE, E. The prevalence of mastitis in small ruminants and the effect of mastitis on ruminant production. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 46**.,** 2007, San Antonio**. Proceedings…** San Antonio: NMC, 2007. p. 119-127.

WIESENTHAL, A.; JUNTER, L.; WANG, S.; WICKLIFFE, J.; WILKERSON, M. Nanoparticles: small and mighty. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 247-254, 2011.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. L. Nanomedicine: a primer for surgeons. **Pediatric Surgery International**, v. 28, p. 943-951, 2012.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKUL, D.; HU, C. M. J.; HUANG, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 585-594, 2010.

ZHAO, F.; ZHANG, X.; GAN, Y. Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. **Journal of Chromatography A**, v. 1055, p. 109-114, 2004.