

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LEUCOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE
CABRAS COM MASTITE EXPERIMENTAL CAUSADA POR
Staphylococcus aureus E *Streptococcus agalactiae***

**Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplicio
Médica Veterinária**

2014

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

**LEUCOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE
CABRAS COM MASTITE EXPERIMENTAL CAUSADA POR
Staphylococcus aureus E *Streptococcus agalactiae***

Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplicio

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal-Martins

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

2014

S612I Simplicio, Kalina Maria de Medeiros Gomes
Leucograma e perfil bioquímico sérico de cabras com mastite experimental causada por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. / Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplicio. -- Jaboticabal, 2014
xviii, 73 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: José Jurandir Fagliari

Coorientador: Ana Maria Centola Vidal Martins

Banca examinadora: Luiz Paulo Martins Filho, Raimundo Souza Lopes, Luiz Francisco Zafalon, Annelise Carla Campesi dos Santos
Bibliografia

1. Biomarcadores. 2. Caprinos. 3. Inflamação. 4. Proteínas de fase aguda. 4. Infecção induzida. 5. Processo agudo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.39

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: LEUCOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE CABRAS COM MASTITE EXPERIMENTAL CAUSADA POR *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae*

AUTORA: KALINA MARIA DE MEDEIROS GOMES SIMPLICIO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

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

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



Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

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



Prof. Dr. LUIZ PAULO MARTINS FILHO

Instituto Qualitas / Pirassununga/SP



Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS

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

Data da realização: 23 de maio de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KALINA MARIA DE MEDEIROS GOMES SIMPLICIO – nascida em 28 de Março de 1981, em Sobral, CE. Formada em Medicina Veterinária e Licenciatura Agrícola pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, em Dezembro de 2005. Em 2006, ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional, do tipo residência, em Clínica Médica Veterinária de Grandes Animais, área de concentração em Clínica Médica de Ruminantes, junto a Clínica de Bovinos de Garanhuns, CBG, Câmpus de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, onde permaneceu durante dois anos sob orientação do Dr. Nivaldo de Azevêdo Costa. Em Fevereiro de 2011 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária pela Universidade Estadual Paulista FCAV/Unesp, tendo sido bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ao longo de toda a execução do curso de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari. Em Março de 2011 iniciou o curso de doutorado, novamente como bolsista FAPESP, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp (área de concentração em Clínica Médica Veterinária), atualmente em fase de conclusão, também sob orientação do prof. Dr. José Jurandir Fagliari.

EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” (Simone de Beauvoir)

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais vidente fica nossa ignorância”

(John F. Kennedy)

*“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”* (Marcel Proust)

DEDICATÓRIAS

A Deus e à minha mãe santíssima Maria, que se mostram presentes a todo momento demonstrando ter um lindo plano traçado para mim, ainda que isso não esteja ao alcance de minha compreensão em alguns momentos.

À minha grande obra, maior amor e razão de viver... minha filha Maya. Ainda nem “cruzamos olhares” e você já me dá mais força, felicidade e uma nova visão de mundo do que eu jamais poderia imaginar.

Aos meus amores, exemplos de vida e melhores amigos, meus pais Aurino e Ruth Simplício. Vocês foram e continuam sendo incansavelmente presentes e atuantes na minha jornada, não medindo esforços para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal. Eu os amo e admiro mais do que jamais poderia verbalizar.

À minha melhor amiga, companheira e meu porto seguro, Kamila Simplício. Você surpreende sempre e me faz te admirar cada vez mais. Por perceber a necessidade na hora certa, por conta própria, e estar sempre presente.

Ao meu grande parceiro e amor Giovanni. Você me deu o presente mais caro e belo que eu poderia ganhar. Por nosso amor que, com sua força, nos faz amadurecer e fortalecer como um só a cada dia.

À amiga Diana Cifuentes, parceira fiel e incansável, sempre pronta para uma “injeção de ânimo”. Por que sem ela este trabalho não teria sido possível.

Aos (às) queridos (as) amigos (as) da “Galera”, em especial à irmã que a vida me deu, Letícia Abrahão Anai. Vocês são muito especiais e certamente tornaram estes anos de árduo trabalho mais leve e gostoso.

Aos animais, em especial aos animais de produção, dos quais se tira tanto sem, muitas vezes, ser a eles propiciado os cuidados mínimos de bem-estar e humanidade a que todo ser vivo deveria, de fato, ter direito.

A meu eterno “primogênito” Pingo *in memoriam*, e meus cinco filhotes Agatha, Liko, Lillie, Ozzie e Princesa, pelos inspiradores olhares, lambidas, grunhidos, miados e latidos tão reconfortantes e cheios de significado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. José Jurandir Fagliari, por ser impecavelmente profissional e ético em todas as suas condutas. Muito obrigado por me orientar com a sabedoria e integridade de um homem de bem.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Centola Vidal Martins pelo conhecimento, presteza e bom humor na execução de boa parte da fase laboriosa do trabalho. Obrigada, acima de tudo, pela amizade e carinho.

Aos graduandos Hugo Bauab, Luciana Tiso e Ana Elisa Cariello, e ao mestrando Victor Santos pela ajuda com o desenvolvimento de toda a parte experimental do estudo. E a todas as graduandas que colaboraram com a amamentação dos cabritinhos, nossos amáveis filhotes temporários.

Aos técnicos do Laboratório de Apoio a Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, Cláudia Nogueira, Renata Nagib Jorge e Paulo César da Silva pela ajuda e solicitude sempre tão bem-humoradas.

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMZ/Unesp, Câmpus de Botucatu, nas pessoas de Fernando Listoni e do Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pela calorosa acolhida e treinamento preparatório para a elaboração dos inóculos.

Aos Profs. Drs. Gener Tadeu Pereira e Antônio Sérgio Ferraudó pela paciente e carinhosa ajuda na análise estatística dos dados.

Ao Laboratório de Estudos em Caprinos da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, na pessoa do Dr. Bruno Biagioli, pela recepção e atenção no recebimento dos animais ao término de cada etapa dos períodos experimentais.

Ao Setor de Digestibilidade da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, nas pessoas de Arturo Samuel Gomez e Luiz Gustavo Rossi, pela solicitude quando os animais precisavam de um “algo mais”, vulgo fluido ruminal, além de alimento, água e carinho *ad libitum*.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, nas pessoas de Cláudia Momo e Juliana Evangelista pela amizade,

carinho e presteza quando havia necessidade de uma necropsia, e à Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado e pós-doutoranda Carla pela ajuda com os ELISAs.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e a todos os seus funcionários, pela oportunidade, acolhida e apoio na realização deste estudo. Um obrigado especial aos funcionários Edson Aguiar, Arildo e Laerte pela sempre bem-humorada ajuda com os animais.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
3. MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1 Animais	08
3.2 Confeção dos inóculos	10
3.3 Colheita e avaliação das amostras de secreção láctea	12
3.3.1 Colheita da secreção láctea	12
3.3.2 Teste da caneca de fundo escuro	12
3.3.3 <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	13
3.3.4 Exames microbiológicos	14
3.4 Colheita das amostras de sangue	14
3.5 Análises laboratoriais	15
3.5.1 Leucograma	15
3.5.2 Teor plasmático de fibrinogênio	15
3.5.3 Perfil bioquímico sérico	15
3.5.4 Eletroforese SDS-Page	16
3.6 Análise estatística	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Exames físico geral e da glândula mamária	18
4.1.1 Grupo inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> (GI)	18
4.1.2 Grupo inoculado com <i>Streptococcus agalactiae</i> (GII)	24
4.2 Análise laboratorial das amostras de secreção láctea	29
4.2.1 Exames microbiológicos	29
4.3 Análise laboratorial das amostras de sangue	31

4.3.1 Leucograma	31
4.3.2 Perfil bioquímico sérico	35
4.3.2.1 Grupo inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> (GI)	35
4.3.2.2 Grupo inoculado com <i>Streptococcus agalactiae</i> (GII)	42
4.3.3 Eletroforese SDS-Page	47
4.3.3.1 Grupo inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> (GI)	47
- Ceruloplasmina	47
- Haptoglobina	48
- α_1 -Glicoproteína ácida	50
4.3.3.2 Grupo inoculado com <i>Streptococcus agalactiae</i> (GII)	53
- Ceruloplasmina	53
- Haptoglobina	54
- α_1 -Glicoproteína ácida	54
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS	58
Apêndice I	70
Apêndice II	71
Apêndice III	72
Apêndice IV	73



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011878/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Leucograma e bioquímica sérica, com ênfase em proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, em cabras com mastite experimental causada por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

LEUCOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE CABRAS COM MASTITE EXPERIMENTAL CAUSADA POR *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae*

RESUMO – Proteínas de fase aguda (PFA) são indicadores sensíveis e precoces de focos inflamatórios. No entanto, as informações disponíveis na literatura em relação à espécie caprina são escassas. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o leucograma e o perfil bioquímico sérico, em especial de PFA, de cabras com mastite induzida por *Staphylococcus aureus* (**Grupo I**) e *Streptococcus agalactiae* (**Grupo II**), a fim de verificar sua importância como biomarcadores precoces da infecção mamária nesta espécie. O GI foi composto por cinco cabras da raça Saanen, inoculadas por via intramamária com cerca de $9,5 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. aureus* e o GII composto por cinco cabras da raça Alpina Francesa inoculadas com aproximadamente $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *S. agalactiae*. O momento experimental imediatamente anterior à inoculação foi denominado M0 e os seguintes identificados como M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7, nos quais eram realizadas colheitas de sangue e leite. Com as amostras de sangue foram obtidos o leucograma, mensuração da concentração plasmática de fibrinogênio, determinação do teor sérico de aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase e creatina quinase, além das concentrações séricas de proteína total, albumina, ureia, creatinina, cálcio total, fósforo, magnésio e ferro, utilizando-se kits comerciais. As concentrações séricas de transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida foram obtidas por meio da técnica de eletroforese SDS-Page. Com as amostras de leite foi realizado acompanhamento da evolução da mastite por meio dos testes da caneca de fundo escuro, *California Mastitis Test* (CMT) e análises microbiológicas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Dunnett, considerando-se 95% de significância ($p < 0,05$). Notou-se que o modelo de infecção experimental desenvolvido para a indução de mastite clínica em cabras foi efetivo, em ambos os grupos. O leucograma e o perfil bioquímico sérico, com exceção das PFA, não foram exames laboratoriais confiáveis no auxílio ao diagnóstico ou no acompanhamento de mastite experimental em cabras, seja ela induzida por *S. aureus* ou *S. agalactiae*. A haptoglobina foi um marcador precoce e confiável na detecção e monitoramento de mastite experimental em cabras, apresentando percentual de elevação sérico de até 444% no GI e 2.500% no GII. A concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida apresentou importância limitada nos grupos GI e GII, tendo sido no GI melhor marcador de cronicidade do que do processo agudo na mastite induzida por *S. aureus*. Fibrinogênio plasmático e ceruloplasmina foram marcadores de importância moderada, com percentuais de elevação de até 67% e 254%, respectivamente no GI e de 129% e 112%, respectivamente no GII.

Palavras-chave: biomarcadores, caprinos, inflamação, proteínas de fase aguda, infecção induzida, processo agudo

LEUKOGRAM AND SERUM BIOCHEMICAL PROFILE IN GOATS WITH INDUCED MASTITIS BY *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae*

ABSTRACT – Acute phase proteins (APP) are sensitive and early indicators of inflammation. However, information regarding goats APP are scarce in the literature. So the aim of this study was to determine the leukocyte count and serum biochemical profile, in particular APP, in goats with induced *Staphylococcus aureus* (**Group I**) and *Streptococcus agalactiae* (**Group II**) mastitis in order to verify its importance as early biomarkers of mammary infection in these species. GI was composed of five Saanen goats inoculated through the teat canal with about 9.5×10^9 colony forming units (CFU) of *S. aureus* and GII consisted of five French Alpine goats inoculated with approximately 4.4×10^{11} CFU of *S. agalactiae*. The experimental moment immediately prior to inoculation was designated M0 and the following identified as M1, M2, M3, M4, M5, M6 and M7 when blood and milk samples were obtained. Leucocyte count and measurement of plasma fibrinogen concentration, serum levels of aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase, creatine kinase, total protein, albumin, urea, creatinine, total calcium, phosphorus, magnesium and iron, were determined with blood samples, using commercial kits. Serum transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin and α_1 -acid glycoprotein were obtained by the SDS-Page Electrophoresis technique. Milk samples were used to monitor the development of clinical mastitis through the strip cup test, California Mastitis Test (CMT) and microbiological analyzes. Data were subjected to analysis of variance and the means to Dunnet test, considering a 95% significance level ($p < 0.05$). It was noted that the experimental infection model developed for the induction of clinical mastitis in goats was effective in both groups. Leucocyte count and serum biochemical profile, with the exception of APP, were unreliable laboratory tests to aid in the diagnosis or monitoring of experimental mastitis in goats, whether induced by *S. aureus* or *S. agalactiae*. Haptoglobin was an early and reliable marker in the detection and monitoring of experimental mastitis, showing percentages of serum elevation of 444% in GI and 2,500% in GII. Serum α_1 -acid glycoprotein showed limited significance, being a better marker of chronic rather than the acute process in *S. aureus* induced mastitis (GI). Plasma fibrinogen and ceruloplasmin were moderate markers with a percentage increase of up to 67% and 254%, respectively in GI and 129% and 112%, respectively in GII.

Key-words: acute phase proteins, biomarkers, caprine, inflammation, induced infection, acute process

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão das contagens de leucócitos (LE; $\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , Grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	34
Tabela 2. Médias e desvio-padrão das contagens de leucócitos (LE; $\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , Grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.....	34
Tabela 3. Médias e desvio-padrão das concentrações séricas de proteína total (PT), albumina (ALB), globulinas (GLB), imunoglobulina G (IgG) e transferrina (TRF) e concentração plasmática de fibrinogênio (FP), de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	37
Tabela 4. Médias e desvio padrão das atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK), e das concentrações séricas de ureia, creatinina (Creat), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	41
Tabela 5. Médias e desvio-padrão das concentrações séricas de proteína total (PT), albumina (ALB), globulinas (GLB), imunoglobulina G (IgG) e transferrina (TRF) e concentração plasmática de fibrinogênio (FP), de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	43
Tabela 6. Médias e desvio padrão das atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK), e concentrações séricas de ureia, creatinina (Creat), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	46
Tabela 7. Percentual de elevação sérica, em %, de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Glic. Ác.) em cabras	

	inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	51
Tabela 8.	Concentrações séricas de ceruloplasmina (CER), haptoglobina (HAP) e α_1 -glicoproteína ácida (G.Á.C.) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	52
Tabela 9.	Percentual de elevação sérica, em %, de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Glic. Ác.) em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GII, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	55
Tabela 10.	Concentrações séricas de ceruloplasmina (CER), haptoglobina (HAP) e α_1 -glicoproteína ácida (G.Á.C.) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cabra do Grupo GI. Antissepsia do teto com álcool 70%, à esquerda, e inoculação intramamária com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , à direita	09
Figura 2. Semeadura das diluições 10^{-1} a 10^{-4} da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar sangue para, após 24 horas de incubação a 37°C, proceder a contagem de unidades formadoras de colônia	11
Figura 3. Semeadura das diluições 10^{-2} a 10^{-5} da cultura de <i>Streptococcus agalactiae</i> em ágar sangue para, após 24 horas de incubação a 37°C, proceder a contagem de unidades formadoras de colônia	11
Figura 4. A. Realização da prova da caneca de fundo escuro; B e C. Realização do <i>California Mastitis Test</i> ; D. Antissepsia do teto com álcool 70% E. Colheita de secreção láctea para posterior processamento laboratorial; F. Material utilizado nas avaliações de rotina da secreção láctea.....	13
Figura 5. Recipientes de coleta individuais para os tetos controle (A) e tetos infectados (B).....	14
Figura 6. Cabra CAP5 com sinais locais e sistêmicos de mastite aguda provocada pela inoculação intramamária de $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> (GI). A. Mama inoculada arroxeadada e edemaciada; B. Enoftalmia; C. Apatia; D. Sensibilidade exacerbada ao toque na mama infectada	19
Figura 7. Nodulação característica de mastite estafilocócica no teto infectado de cabra do grupo GI	20
Figura 8. Aspecto da secreção láctea no teste da caneca de fundo escuro da cabra CAP5, inoculada por via intramamária com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> (GI), às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3) e 96h (M4) após a inoculação	22
Figura 9. Aspecto da mama da cabra CAP5 inoculada com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>S. aureus</i> (GI) às 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	22
Figura 10. Cabra CAP1' submetida à inoculação intramamária com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> (GII), apática às 48h (M2) após a inoculação	27
Figura 11. Sequência de testes da caneca de fundo escuro na secreção láctea da cabra CAP1' (GII), inoculada com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> (GII) por via intramamária, no dia da inoculação (M0) 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	28
Figura 12. Sequência de <i>California Mastitis Test</i> na secreção láctea da cabra CAP1' (GII), apresentando reação negativa em ambos os tetos antes da inoculação (M0) e positiva no teto direito (TD) às 24h (M1), 48h (M2), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	28
Figura 13. Exemplo de sequência de acompanhamento microbiológico em cabra do grupo GI. A. M0 (prévio à inoculação), sem multiplicação	

	bacteriana; B, C e D. Multiplicação bacteriana com halo hemolítico característico de <i>Staphylococcus aureus</i> após inoculação no teto direito (metade direita da placa de Petri) e ausência de multiplicação bacteriana no teto esquerdo controle (metade esquerda da placa de Petri)	30
Figura 14.	Percentual de elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio em cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	38
Figura 15.	Percentual de elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GII, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	44
Figura 16.	Percentual de elevação das concentrações séricas de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Gli.Ác.) em cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> , grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	51
Figura 17.	Percentual de elevação das concentrações séricas de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Gli.Ác.) em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de <i>Streptococcus agalactiae</i> , grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação	55

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de leite de cabra do continente americano. O mercado de produtos lácteos de leite caprino tem grande potencial de crescimento em função da melhor digestibilidade, alcalinidade e capacidade de tamponamento quando comparado ao leite de outras espécies (PARK et al., 2007; SILANIKOVE et al., 2010). No entanto, um fator limitante à produção leiteira é a presença da mastite que tem como principal agente etiológico bacteriano o *Staphylococcus aureus* (AIRES de SOUSA et al., 2007). Os estreptococos são considerados o segundo grupo em importância na etiologia da mastite, dentre eles *Streptococcus agalactiae*, embora menos prevalentes em caprinos que em bovinos (CONTRERAS et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Infecções da glândula mamária devem ser detectadas no estágio inicial, com base em técnicas de diagnóstico confiáveis, as quais ainda não estão bem estabelecidos para o leite de cabra (STUHR et al., 2013).

Vários estudos ao longo das últimas décadas identificaram e vêm explorando o potencial diagnóstico e de fator prognóstico de um grupo de proteínas, conhecidas como proteínas de fase aguda (PFA). Essas proteínas têm demonstrado ser indicadores altamente precoces e sensíveis de focos inflamatórios e/ou infecciosos (CRAY, 2012; THULASIRAMAN et al., 2013). No entanto, há significativa variação na responsividade de diferentes PFA entre espécies e ainda é necessária a padronização dos ensaios para mensuração dessas proteínas antes que possam ser aplicados na rotina da clínica médica veterinária, seja para monitoramento de rebanhos ou de indivíduos (JAIN et al., 2011).

Apesar do valor clínico que as PFA podem ter na clínica médica de caprinos, há pouca informação disponível na literatura científica (GONZÁLEZ et al., 2008). O desenvolvimento de uma infecção intramamária experimental em cabras pode auxiliar no estudo da cinética, responsividade e potencial das proteínas de fase aguda nesta espécie. Portanto, o objetivo deste estudo foi elaborar um protocolo de infecção experimental para mastite clínica em cabras, com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* e avaliar o leucograma e o perfil bioquímico sérico, em especial a cinética de proteínas de fase aguda, de cabras da

raça Saanen e Alpina Francesa com mastite experimental causada por estes microrganismos. Determinar ainda, a viabilidade das proteínas de fase aguda ceruloplasmina, haptoglobina, α_1 -glicoproteína ácida e fibrinogênio plasmático como biomarcadores para diagnóstico precoce e acompanhamento da mastite clínica aguda nesta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os ruminantes a cabra é a terceira espécie produtora de leite, em volume. Estima-se que em 2006 foram produzidos 13,8 mil toneladas de litros de leite de cabra no mundo, o que corresponde a 2,0% da produção mundial (ZOCCAL, 2007). Segundo dados de 2007 da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) existem no Brasil cerca de 13 milhões de caprinos, enquadrando o rebanho brasileiro como o décimo do mundo em número de animais. Todavia, a produção de leite de cabra contribui apenas com 1,3%, aproximadamente 141 mil toneladas por ano, contrastando com países como a França, com uma produção de 500 mil toneladas de leite de cabra por ano e onde o queijo caprino é tido como uma iguaria, sendo vendido pelos preços mais altos do mercado (SILANIKOVE et al., 2010).

A maior produção de leite de cabra no continente americano é obtida no Brasil. Novos mercados e utilidades para o leite caprino estão sendo perseguidos, uma vez que ele difere do leite bovino e do humano por apresentar melhor digestibilidade, alcalinidade e capacidade de tamponamento, o que o qualifica como alimento portador de valor terapêutico para a nutrição humana (PARK et al., 2007; SILANIKOVE et al., 2010).

Um fator limitante ao processo produtivo, e em decorrência à agroindústria leiteira é a presença de enfermidades, em especial de mastite, pois a qualidade do leite é forte e negativamente afetada (BAZAN et al., 2009). Vários estudos sobre mastite bovina têm sido desenvolvidos, visando compreender melhor o mecanismo de instalação dos principais patógenos no tecido mamário e conseqüentemente investigar meios de inviabilizar o estabelecimento destes microrganismos. Embora as conseqüências deletérias qualitativas e quantitativas da mastite no leite tenham sido reportadas como mais significativas em pequenos ruminantes que em bovinos (LEITNER et al., 2004), comparativamente, poucos estudos têm sido realizados na espécie caprina (LASAGNO et al, 2012).

O termo mastite refere-se a um processo inflamatório da glândula mamária que usualmente é causado por uma infecção bacteriana, embora possa ter como agente etiológico vários outros tipos de microrganismos ou mesmo ter aspecto multifatorial.

Mastite é a enfermidade mais economicamente custosa à indústria leiteira em função da redução na produção e qualidade do leite, custos com tratamento dos animais afetados e honorários veterinários e custos com reposição de animais (BERGONIER et al., 2003; AITKEN et al., 2011). Embora várias bactérias sejam capazes de causar mastite, *Staphylococcus aureus* é o mais importante agente etiológico da infecção mamária na maioria dos ruminantes domésticos (AIRES de SOUSA et al., 2007).

Segundo Pizoni et al. (2010), *S. aureus* é importante agente causador da mastite caprina. Mork et al. (2010) verificaram que *S. aureus* está frequentemente presente nas membranas mucosas das narinas e da vagina de cabras leiteiras e que a presença deste patógeno em outros locais do corpo, além da glândula mamária, pode contribuir para a disseminação da bactéria no rebanho. Esta bactéria secreta várias toxinas que contribuem para a lesão tecidual e também têm importante papel em doenças de origem alimentar, mesmo quando do uso de leite pasteurizado, devido às enterotoxinas termoestáveis que produzem (CONTRERAS et al., 2007). A importância do *S. aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada por levantamentos epidemiológicos relacionando-o à ocorrência de toxinfecções alimentares. Pesquisas no Brasil indicam o microrganismo como um dos principais contaminantes de leite cru (ALVES et al., 2006).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, com formato esférico, imóvel, não esporulada, anaeróbia facultativa, com aproximadamente 1 µm de diâmetro e que tende a formar grupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva (QUINN et al., 2005). A causa da intoxicação não é o microrganismo em si, mas a enterotoxina produzida e liberada no alimento. A enterotoxina é termorresistente, ou seja, não é destruída à exposição em temperatura de 100,0 °C durante 30 minutos (ALVES et al., 2006). A intoxicação das pessoas por espécies de *Staphylococcus* spp é um dos tipos mais comuns de doença transmissível por alimento, sendo *S. aureus* o agente mais envolvido (RAPINI et al., 2005).

Os estreptococos são considerados o segundo grupo de microrganismos em importância na etiologia da mastite dos ruminantes, embora sejam moderadamente menos prevalentes em caprinos do que em bovinos. Quatro espécies são geralmente detectadas na maioria dos rebanhos: *Streptococcus agalactiae*, *S.*

dysgalactiae, *S. bovis* e *S. uberis* (CONTRERAS et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Na maioria das vezes causam mastite clínica e vários estudos epidemiológicos apontam a sua ausência nos casos inaparentes ou subclínicos. A ocorrência de mastite ocasionada por estreptococos em cabras leiteiras muitas vezes está associada à contaminação fecal, em especial má condição do material utilizado na cama (CONTRERAS et al., 2001).

Os estreptococos são bactérias Gram-positivas, quase sempre imóveis, não formam esporos, possuem forma esférica e suas dimensões variam entre 0,6 a 1,0 µm. Quando em meios sólidos formam cadeias curtas ou pares; em meios líquidos as cadeias podem ser longas ou agrupadas. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativa e fermentam açúcares. Estão distribuídos na natureza como comensais e causam uma série de doenças às pessoas e aos animais, sendo importantes saprófitos de leite e produtos lácteos (GOMES, 2008).

S. agalactiae é causa comum de mastite bovina, com distribuição mundial, podendo causar também mastite em cabras e ovelhas. Em algumas amostras os microrganismos são numerosos e facilmente encontrados; em outras, o número de bactérias é escasso e detectado com grande dificuldade, mesmo no leite aparentemente normal. O habitat de *S. agalactiae* é a glândula mamária de cabras, ovelhas e vacas. As bactérias são transmitidas pelas mãos do ordenhador e pelo equipamento de ordenha; às vezes, a boca da cria pode servir como via de transferência para a glândula mamária de fêmeas sadias. O microrganismo penetra pelo esfíncter do teto e coloniza a mama, o que favorece a adesão ao epitélio do teto, causando inflamação lenta e progressiva com fibrosamento das áreas circunvizinhas. A doença ocorre de forma gradual e os animais mais velhos são mais frequentemente acometidos. A involução do parênquima secretor provoca perda de produtividade, causada pelo bloqueio do fluxo do leite e pela inflamação (GOMES, 2008).

A demanda por marcadores de qualidade para produtos de origem animal como o leite é cada vez maior em função da possibilidade de classificar estes produtos em uma escala de qualidade, viabilizando o fornecimento de matéria prima de excelência à indústria. Esses marcadores são úteis no monitoramento e otimização de processos industriais, maximizando o ganho da indústria alimentícia

(BENDIXEN et al., 2011). Neste contexto, as proteínas de fase aguda (PFA) são indicadores altamente sensíveis de inflamação, porém não apresentam na mesma medida especificidade, havendo marcante diferença na resposta dessas PFA entre diferentes espécies. Numerosos estudos demonstram que distintas PFA comportam-se de modo diferente diante de cada processo inflamatório em curso (ECKERSALL; BELL, 2010; JAIN et al, 2011; CRAY, 2012; THULASIRAMAN et al., 2013).

Estas proteínas foram ainda consideradas indicadores potenciais de doença e bem estar em animais, individualmente, bem como de saúde do rebanho (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CRAY, 2012). Em nível de rebanho, as PFA podem ser úteis em determinar o ponto de partida do foco inflamatório/infeccioso, fornecendo informações acerca da prevalência de infecções clínicas e subclínicas em curso, a partir das elevações nas concentrações séricas de determinadas PFA. Estas serviriam ainda como ferramenta para o estabelecimento de prognósticos, a partir da observação da magnitude e duração da elevação das PFA, refletindo a gravidade da infecção. No entanto, uma padronização internacional dos ensaios para mensuração de PFA é necessária antes que estes testes possam ser aplicados no monitoramento sistemático de higidez de rebanhos em medicina veterinária (JAIN et al., 2011).

Em ruminantes, concentrações aumentadas de PFA, como o fibrinogênio e a haptoglobina, podem ser indicadores mais sensíveis de inflamação aguda do que alterações na contagem leucocitária. A concentração circulante destas proteínas está relacionada à severidade da condição orgânica e, portanto, sua quantificação propicia prontamente um meio de avaliar a presença e a extensão da inflamação (ECKERSALL, 2000; TAYLOR, 2000; O'MAHONY et al., 2006). Vale salientar que doenças inflamatórias inaparentes também podem induzir aumento nas concentrações de PFA (GRÖNLUND et al., 2005), fato ressaltado por Ceciliani et al. (2012) que apontaram a mensuração dessas PFA como uma de suas principais aplicações na medicina veterinária buiatra, detectando e monitorando a mastite subclínica.

Apesar do valor clínico que as determinações de PFA poderiam ter na clínica médica veterinária de caprinos, há pouca informação disponível na literatura científica (GONZÁLEZ et al., 2008). A resposta de fase aguda tem sido estudada em

bovinos e ovinos, sendo a haptoglobina e a amilóide sérica-A consideradas os indicadores inflamatórios de maior importância (BENDIXEN et al., 2011; CECILIANI et al., 2012). Comumente o conhecimento adquirido em pesquisas com bovinos é traduzido como verdade para outras espécies ruminantes, como caprinos e ovinos. No entanto, sabe-se da existência de diferenças entre espécies, as quais devem ser sempre levadas em conta (CHIARADIA et al., 2012). Neste contexto Stuhr et al. (2013) ressaltam a falta de critérios adequados para o monitoramento da saúde da glândula mamária de cabras, especialmente sob condições de campo. González et al. (2008), também chamaram a atenção para a necessidade de estudos mais expressivos na espécie caprina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV – Unesp – Câmpus de Jaboticabal (protocolo nº 011878/11).

3.1. Animais

Foram avaliadas 20 glândulas (metades) mamárias de 10 cabras das raças Saanen e Alpina Francesa, de 2ª ordem de parto, selecionadas após exame clínico geral dos animais e das glândulas mamárias (PUGH, 2005) e constatação de resultado negativo nos testes da caneca de fundo escuro, no *California Mastitis Test* e em exames microbiológicos do leite bem como em provas sorológicas para o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV). Estas últimas foram realizadas no Laboratório Biovetech, empresa de biotecnologia vinculada a Universidade Federal de Pernambuco, em Recife, PE.

As cabras foram submetidas à adaptação alimentar e ambiental durante um período mínimo de sete dias, recebendo ração concentrada, feno de *coast cross*, água e sal mineral à vontade e mantidos em gaiolas individuais, no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

Foram constituídos dois grupos experimentais: **GI**, com cinco cabras da raça Saanen (CAP1, CAP2, CAP3, CAP4 e CAP5) que receberam inóculo intramamário contendo cerca de $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*; e **GII**, com cinco cabras da raça Alpina Francesa (CAP'1, CAP'2, CAP'3, CAP'4 e CAP'5), que receberam pela mesma via aproximadamente $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*. Os animais tiveram o teto direito inoculado e o teto esquerdo mantido como controle, sem inoculação. Assim, entre o 12º e 15º dias pós-parto, todas as cabras foram submetidas à inoculação intramamária de 1mL do inóculo acrescido de 2mL de água peptonada como veículo, no teto direito (Figura 1).



Figura 1. Cabra do grupo GI. Antissepsia do teto com álcool 70%, à esquerda, e inoculação intramamária com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, à direita.

Uma vez iniciado o período experimental, as cabras foram submetidas ao exame físico geral e da glândula mamária (PUGH, 2005) e a colheitas diárias de sangue e de leite durante nove dias, sendo a primeira amostra obtida no dia da inoculação, porém imediatamente antes do procedimento por via intramamária (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação (PI). Ao término deste período foi realizado tratamento antimicrobiano tópico, com base nos resultados do antibiograma de amostras de secreção láctea. Nas cabras do grupo GI foi aplicada uma bisnaga de gentamicina (Mastifin®), por via intramamária, após esgotamento da mama, diariamente, durante 5 dias. Logo após a aplicação eram feitas massagens em sentido ascendente para melhor distribuição do medicamento na glândula. Naqueles animais que apresentavam sinais de desidratação, dor, hipertermia e apatia foram aplicadas uma ou duas doses de 2,2 mg/Kg do anti-inflamatório não esteroide flunixinina meglumina (Banamine®) a cada 24h, por via intramuscular e hidratação intravenosa lenta com 1L de solução glicofisiológica 5%. Ainda, nas cabras que desenvolveram anorexia ou significativa diminuição do apetite foi realizada também transfaunação de fluido rumenal por meio de sonda orogástrica, uma vez ao dia, até que o animal voltasse a se alimentar por conta própria.

Nas cabras pertencentes ao grupo GII foi aplicada, por via intramamária e durante 5 dias consecutivos, uma bisnaga antibiótica de ciprofloxacina (Ciprolac®) de aplicação intramamária. Logo após a aplicação também eram feitas massagens em sentido ascendente para melhor distribuição do medicamento na mama. Neste grupo, não houve necessidade de tratamento sistêmico de qualquer natureza.

3.2. Confeção dos inóculos

Foram utilizadas cepas de campo de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Ana Maria Centola Vidal-Martins, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Câmpus de Pirassununga. Ambas cepas foram recuperadas de casos clínicos de mastite caprina aguda de ocorrência natural.

Para obtenção da cultura padrão, *S. aureus* ou *S. agalactiae* foi inoculado em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) e incubado a 37°C por 24 horas. Posteriormente, 1mL deste inóculo foi transferido para tubo de ensaio contendo 9mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição seriada 10^{-13} . Após a realização das diluições, 0,1mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri contendo ágar sangue, com 5% de sangue ovino desfibrinado, em duplicata, para a contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (POSTLE et al., 1978) (Figuras 2 e 3). Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente. Ao final, após realização de projetos piloto para padronização da dose e do protocolo da técnica de confecção e infecção, no grupo GI foi utilizado inóculo contendo aproximadamente $9,5 \times 10^9$ UFC da *S. aureus* e para o grupo GII o inóculo continha cerca de $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *S. agalactiae*.

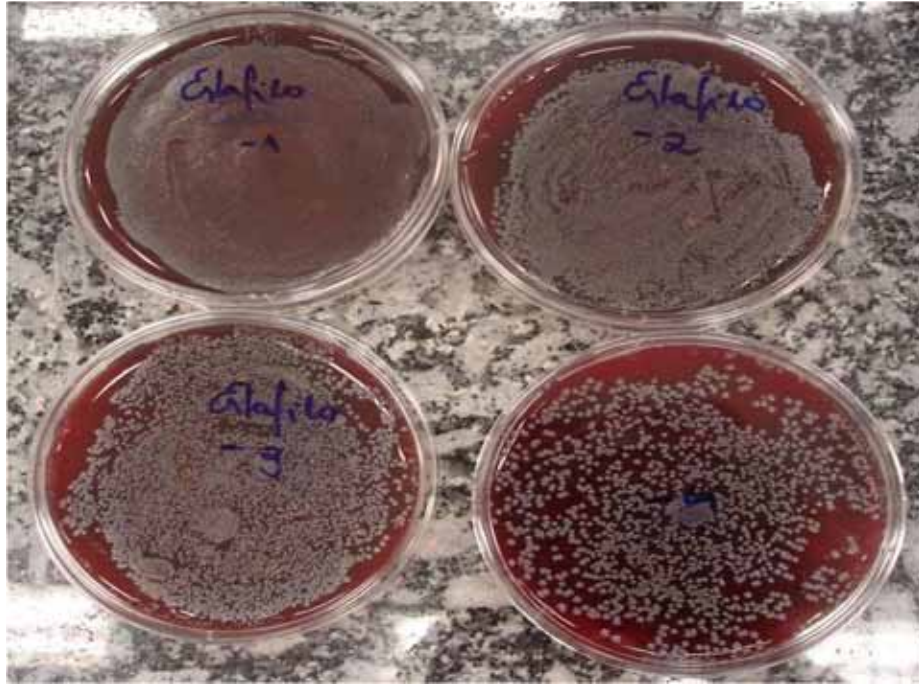


Figura 2. Semeadura das diluições 10^{-1} a 10^{-4} da cultura de *Staphylococcus aureus* em ágar sangue para, após 24 horas de incubação a 37°C , proceder à contagem de unidades formadoras de colônia.

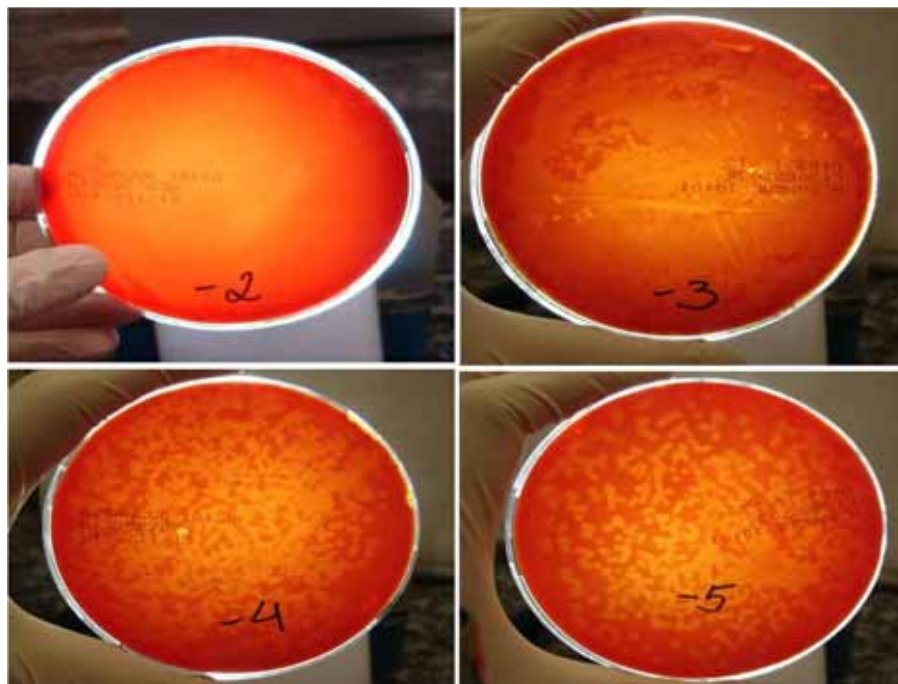


Figura 3. Semeadura das diluições 10^{-2} a 10^{-5} da cultura de *Streptococcus agalactiae* em ágar sangue para, após 24 horas de incubação a 37°C , proceder à contagem de unidades formadoras de colônia.

3.3 Colheita e avaliação das amostras de secreção láctea

O exame da glândula mamária e avaliação da secreção láctea seguiram a mesma sequência, horário e rigor de execução em ambos os grupos GI e GII, como é descrito a seguir e pode ser visualizado nas Figuras 4 e 5.

A mama controle era a primeira a ser inspecionada e examinada por meio de palpação do parênquima mamário e teto correspondente. Em seguida, procedia-se com uma primeira limpeza do teto com álcool 70% e realização dos testes da caneca de fundo escuro (Figura 4A) e *California Mastitis Test* (CMT) (Figuras 4B e 4C). Na sequência, o teto era novamente desinfetado com álcool 70% para colheita das amostras de secreção láctea para análise microbiológica do leite (Figura 4D). Ao final, era realizado o esgotamento da mama. Terminados os procedimentos na mama controle, a mesma sequência era realizada na mama inoculada. Ressalte-se que todo o material, de ambos os grupos, foi identificado e separado objetivando minimizar as chances de contaminação cruzada (Figura 5A e 5B).

3.3.1 Colheita da secreção láctea

Para obtenção asséptica da secreção láctea de cada metade mamária foram obtidos cerca de 10 mL de leite, em tubo estéril (Figura 4E), segundo recomendações de Carter e Wise (2004). Após o acondicionamento em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, as amostras foram transportadas para análise microbiológica no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA – USP, Pirassununga-SP.

3.3.2 Teste da caneca de fundo escuro

O teste foi realizado antes do CMT (Figuras 4B e 4C) e da ordenha (Figura 4A e 4B), após desprezar os três primeiros jatos de leite, a fim de avaliar o aspecto da secreção láctea e identificar ou excluir a presença de mastite clínica (Figura 4A).

3.3.3 California Mastitis Test (CMT)

Para realização do CMT (Figuras 4B e 4C), foi utilizado reagente aniônico neutro (CMT-FATEC S.A.; São Paulo, Brasil) e o resultado foi avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, segundo recomendações de Philpot e Nickerson (1991).



Figura 4. A. Realização da prova da caneca de fundo escuro; B e C. Realização do *California Mastitis Test*; D. Antissepsia do teto com álcool 70%; E. Colheita de secreção láctea para posterior processamento laboratorial; F. Material utilizado nas avaliações de rotina da secreção láctea.

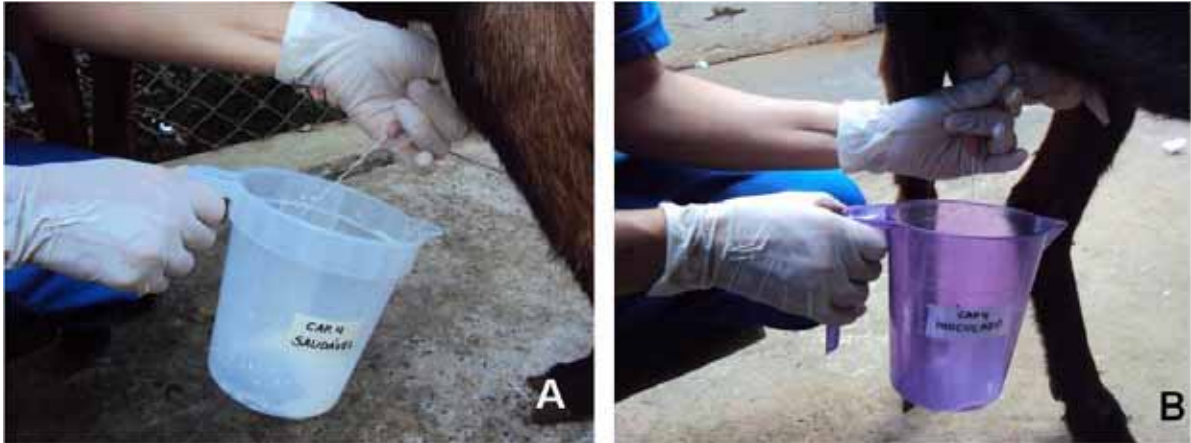


Figura 5. Recipientes de coleta individuais para os tetos controle (A) e tetos infectados (B).

3.3.4 Exames microbiológicos

Para a análise microbiológica da secreção láctea foram obtidas, assepticamente, amostras de leite de cada glândula nos momentos M0 a M7. Após o cultivo em placa de ágar-sangue 5,0% por 24 a 48h, as colônias suspeitas foram isoladas e identificadas de acordo com as recomendações de Kloos e Lambe (1991) e Varnam e Evans (1991), utilizando-se coloração de Gram, atividade da coagulase, produção de pigmento, hemólise, prova da catalase, fermentação da glicose e manitol em aerobiose e anaerobiose, respectivamente, produção de acetoína pela prova de Voges-Proskauer e teste de CAMP (MacFADIN, 1976).

3.4 Colheita das amostras de sangue

Para realização do leucograma e mensuração do teor plasmático de fibrinogênio, foram obtidas amostras de 4mL de sangue, colhidas mediante venopunção jugular, com agulha 25x8 mm própria para tubos a vácuo, em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (K_2 -EDTA).

Para determinação do perfil bioquímico sérico, foram obtidos 10mL de sangue, também colhidos mediante venopunção jugular, em tubos sem anticoagulante. Estes tubos eram deixados em repouso por cerca de 10 minutos para retração do coágulo e, em seguida, centrifugados a 3000rpm. Em seguida, as

alíquotas de soro sanguíneo eram extraídas e acondicionadas em *freezer* a -80°C , para posterior análise laboratorial.

3.5 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais das amostras de sangue foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do DCCV – FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

3.5.1 Leucograma

A contagem total de leucócitos foi obtida em contador semiautomático (poch-100 iV, Diff). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo usando-se a coloração de Wright-Giemsa, segundo recomendações de Jain (1993), contando-se o total de 100 células.

3.5.2 Teor plasmático de fibrinogênio

A determinação da concentração plasmática de fibrinogênio foi realizada em espectrofotômetro portátil (Modelo T2-NE *Clinical*, ATAGO co, Ltda) segundo técnica da precipitação pelo calor, descrita por Jain (1993).

3.5.3 Perfil bioquímico sérico

As atividades séricas das enzimas gamaglutamiltransferase (método de Szasz modificado), aspartato aminotransferase (método cinético UV-IFCC), creatina quinase (método IFCC) e fosfatase alcalina (método de Bowers e McComb modificado), bem como as concentrações de proteína total (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol), ureia (método enzimático UV), creatinina (método Labtest), cálcio total (método de CPC), fósforo (método de Daly e Ertinghausen modificado), magnésio (método Labtest), e ferro (método de Goodwin modificado) foram obtidas empregando-se reagentes comerciais (Labtest

Diagnóstica, Belo Horizonte/MG, Brasil). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático (Labquest, Labtest, Belo Horizonte/MG, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

3.5.4 Eletroforese SDS-Page

A separação das frações proteicas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-Page), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após fracionamento o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída por metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de coomassie (0,25%). Em seguida, o gel foi colocado em solução de ácido acético 7% para remoção do excesso de corante, até que frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações das proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (CS-9301 PC, Shimadzu). Como referência foi utilizada solução marcadora (Sigma) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (D), além das proteínas purificadas transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina, α_1 -antitripsina e IgG.

3.6 Análise Estatística

A análise de variância (teste “F” ANOVA) de medidas repetidas foi o método estatístico usado para as variáveis referentes ao leucograma, concentrações séricas de minerais, enzimas hepáticas, ureia, creatinina, proteína total, albumina, globulinas, imunoglobulina G e transferrina. As comparações dois a dois das médias foram obtidas usando o teste de Dunnet, sendo valores de $P < 0,05$ considerados significativos. Toda a análise estatística foi auxiliada pelo programa SAS (*Statistical Analysis System*).

As concentrações séricas das proteínas de fase aguda positivas ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida são apresentadas no formato “média \pm desvio padrão”, com exposição de valores referentes aos limites inferior e superior obtidos para cada proteína. Os dados que se referem ao exame físico da

glândula mamária e secreção láctea estão dispostos de forma descritiva, em apêndices ao final do documento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Exame físico geral e da glândula mamária

4.1.1 Grupo inoculado com *Staphylococcus aureus* (GI)

Todos os animais pertencentes ao Grupo GI, com exceção da CAP4, apresentaram sinais clínicos locais, e às vezes sistêmicos, de mastite. Na CAP4, embora não tenha sido observada sintomatologia clínica de mastite, em todos os momentos experimentais houve recuperação da bactéria no teto inoculado e positividade do leite obtido desse teto ao teste do CMT.

Os resultados das avaliações das glândulas mamárias das cinco cabras do Grupo GI, quanto ao aspecto, à textura do parênquima e à temperatura local estão compilados no Apêndice III. Embora não haja nenhuma intenção de comparar os resultados obtidos nos Grupos I e II, vale ressaltar a marcante resposta clínica nos animais inoculados com *S. aureus* (GI) comparativamente àquela notada em cabras inoculadas com *S. agalactiae* (GII). Em uma cabra do GI foi possível observar, além de sinais locais de mastite aguda, presença de sinais sistêmicos da enfermidade, como febre, apatia, diminuição acentuada do apetite e sepsis (Figura 6).

Com frequência, nos tetos inoculados com *S. aureus* foi possível observar nodulações (Figura 7), provavelmente por ser este microrganismo um invasor tecidual; e pequenas vesículas epidérmicas superficiais. Marogna et al. (2010), citam como “resultados interessantes” esses achados e relatam que o isolamento de *S. aureus* de casos naturais de mastite ovina mostrou correlação significativa com vários sinais clínicos, dentre eles a presença de nódulos e vesículas epidérmicas. Deinhofer e Pernthaner (1995) consideraram a glândula mamária de cabras como “mastítica” quando havia graus variáveis de achados patológicos, inclusive macro ou micronodulações. Ainda, o isolamento de *S. aureus* também foi significativamente correlacionado à presença de nódulos e vesículas em cabras com mastite de ocorrência natural (MAROGNA et al., 2012).



Figura 6. Cabra CAP5, no M2, com sinais locais e sistêmicos de mastite aguda provocada pela inoculação intramamária de $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus* (GI). **A.** Mama inoculada arroxeadada e edemaciada; **B.** Enoftalmia; **C.** Apatia; **D.** Sensibilidade exacerbada ao toque na mama infectada.



Figura 7. Nodulação característica de mastite estafilocócica, no teto infectado de cabra do grupo G1.

Com exceção da cabra CAP4, em todas as fêmeas do grupo G1 notou-se alteração no aspecto da secreção láctea entre 24h (M1) e 48h (M2) após a inoculação (PI). Nestes quatro animais, CAP1, CAP2, CAP3 e CAP5, foi possível constatar aspecto “aguado” do leite em dois ou mais momentos experimentais. O aspecto “denso” foi verificado no leite das cabras CAP2 e CAP3 em M2 e M1 a M4, respectivamente. Alterações no aspecto físico do leite foram analisadas anteriormente quanto à correlação com culturas bacteriológicas positivas, mostrando em estudo com ovelhas com mastite uma correlação positiva de 154% (MAROGNA et al., 2010). Já em relação à mudança de coloração da secreção láctea, notou-se coloração “amarelada” do leite em todas as fêmeas após a inoculação, sendo essa alteração em geral observada às 48h PI (M2).

Quanto à presença de grumos, o leite de todos os tetos inoculados, excetuando-se da cabra CAP4, apresentaram grumos no leite já no M1. Nas cabras CAP1 e CAP3 cessaram os grumos no M2 e nas cabras CAP2 e CAP5 foram vistos grumos na secreção láctea até o penúltimo momento do estudo (M6).

A cabra CAP5 apresentou forte reação à inoculação intramamária, evoluindo para uma mastite gangrenosa, quadro agudo clássico causado por *S. aureus* em função de seu elevado potencial patogênico e em geral acompanhado por altas taxas de morbidade e de mortalidade (CONTRERAS et al., 2007). Essa cabra apresentou mastite clínica, ou seja, resultado positivo ao teste da caneca de fundo escuro, às 24h PI (M1), quando foram detectados pequenos grumos no leite. A partir daí observou-se aumento progressivo da quantidade de grumos, até que a secreção perdesse as características de leite, assumindo aspecto sero-sanguinolento (Figura 8).

Na Figura 9, é possível notar a progressão da mastite na glândula mamária inoculada da CAP5. Às 48h PI (M2) esta mama apresentou-se edemaciada, sensibilidade exacerbada à palpação e com aumento de temperatura local, tornando difícil a colheita de amostras e a ordenha. No dia seguinte (M3) foi possível observar locais arroxeados típicos de focos necróticos, no epitélio mamário. No M4 toda a mama apresentava coloração escura, fria e com hipoestesia ao toque. No M5 a cabra já não apresentava sensibilidade quando manuseada e a glândula estava totalmente fria à palpação. Em M6 e M7 a linha de delimitação da área necrosada era evidente e o tecido mamário encontrava-se desvitalizado. Quadro clínico semelhante foi detalhadamente descrito por Tariq et al. (2014), em cabra com mastite gangrenosa causada por *S. aureus*. O relato assemelha-se muito ao observado nesta cabra, com a única diferença de, no relato destes autores, tratar-se de uma infecção de ocorrência natural.

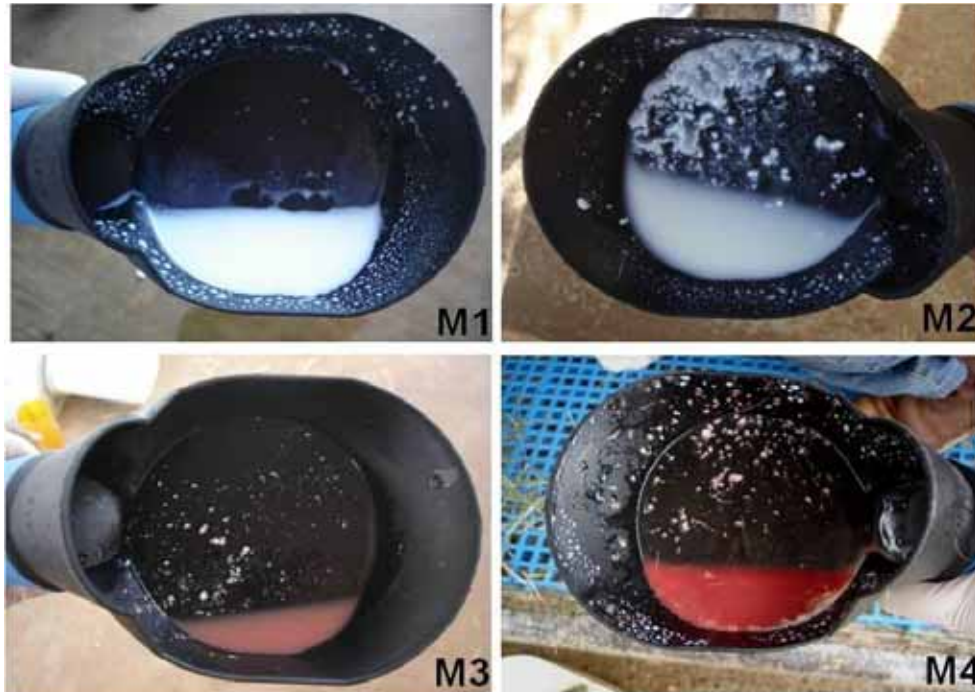


Figura 8. Aspecto da secreção láctea no teste da caneca de fundo escuro da cabra CAP5 inoculada com $9,5 \times 10^9$ UFC de *S. aureus* (GI), às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3) e 96h (M4) após a inoculação.



Figura 9. Aspecto da mama da cabra CAP5, inoculada com $9,5 \times 10^9$ UFC de *S. aureus* (GI), às 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

Os outros animais submetidos à inoculação intramamária com $9,5 \times 10^9$ UFC de *S. aureus*, CAP1, CAP2, CAP3 e CAP4, embora tenham desenvolvido quadro de mastite clínica, tiveram os sinais clínicos restritos à glândula mamária, não apresentando alteração relevante do quadro clínico geral em nenhum dos momentos experimentais. Nestes animais, em situação a campo, provavelmente a doença evoluiria para o quadro crônico causado por *S. aureus*, bastante relatado na literatura e caracterizado por infecções subclínicas recorrentes com presença de nodulações e abscessos no parênquima mamário. Ressalte-se a alta associação com relatos de intoxicação de origem alimentar em relação ao leite e aos produtos lácteos oriundos de propriedades com alta prevalência de mastite inaparente (CONTRERAS et al., 2007; AITKEN et al., 2011; MAROGNA et al., 2012).

O teste CMT, usado ao longo do estudo para avaliar a presença ou ausência de mastite subclínica concordou com os resultados obtidos nas análises microbiológicas na maioria dos casos. No entanto, também foi constatada reação positiva ao CMT com correspondente resultado negativo na cultura microbiológica de uma mesma amostra de secreção láctea, como pode ser observado nos resultados das amostras oriundas dos tetos controle das cabras CAP3 e CAP4 submetidas a esta prova (Apêndice I). Em concordância com estes achados, Contreras et al. (2013) estudando mastites causadas por micoplasmas em cabras concluíram que o CMT é de uso limitado nesta espécie quando comparado ao uso em vacas e ovelhas, ressaltando que o resultado do teste deve ser interpretado em associação à contagem de células somáticas e culturas bacteriológicas no leite. Em discordância, Persson e Olofsson (2011) afirmaram que o uso do CMT associado a um contador portátil de células somáticas em cabras foi confiável como preditor da presença de infecção intramamária nesta espécie. É provável que o CMT seja um teste com maior confiabilidade quando trata-se de indicar a ausência de infecção intramamária do que a indicação da presença desta, como observado na maioria das amostras de secreção láctea testadas neste estudo e como sugeriram Perrin et al. (1997), Petzer et al. (2008) e Shivairo et al. (2013) em estudos com cabras.

Um aspecto que deve ser mencionado e levado em conta quando se trata de experimentação com seres vivos é a influência da variabilidade individual nos

resultados obtidos, como foi observado nas cabras CAP4, que apresentou discreta resposta à inoculação intramamária e CAP5, que evidenciou intensa resposta local e sistêmica à inoculação intramamária no Grupo GI. Aitken et al. (2011) discutiram sobre esse aspecto postulando que a eficiência na resposta do sistema imune inespecífico não apenas determina se ocorrerão infecções intramamárias futuras, mas também influencia a gravidade e a duração do quadro de mastite por influenciar a natureza da resposta imune adaptativa de cada indivíduo.

Terminado o período experimental, amostras de secreção láctea de todos os tetos inoculados foram colhidas e delas foi obtido à antibiograma para determinar o melhor procedimento terapêutico. Em todas as amostras, o antibiótico ao qual a cepa de *S. aureus* utilizada mostrou maior sensibilidade foi a gentamicina, concordando com o relato de estudos prévios na espécie caprina (NATHAWAT et al., 2013; ISLAM et al., 2012; PEIXOTO et al., 2010). A constatação do sucesso do tratamento foi obtida por meio de culturas microbiológicas negativas seriadas.

4.1.2 Grupo inoculado com *Streptococcus agalactiae* (GII)

Todas as cabras do grupo GII (CAP1', CAP2', CAP3', CAP4' e CAP5') apresentaram mastite clínica em resposta à inoculação intramamária de $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*. No entanto, os sinais clínicos mantiveram-se, em geral, restritos à glândula mamária. Na espécie caprina, apenas um relato de indução de mastite com *S. agalactiae* foi encontrado (LI et al., 2004), no qual os autores avaliaram a indução de mastite subclínica. Neste estudo foi utilizada dose de inóculo relativamente alta em relação àquela mencionada na literatura. No entanto, isso deve-se ao objetivo de provocar mastite clínica aguda nos animais e não apenas subclínica.

Em estudo sobre a correlação entre diferentes sinais clínicos na mama de ovinos com mastite e a positividade à cultura microbiológica, Marogna et al. (2010) constataram que os animais que apresentavam áreas de endurecimento no parênquima mamário tinham 115% mais probabilidade de serem positivos nas provas de cultivo bacteriológico das amostras de leite. Em concordância com essa relação, quatro das cinco cabras do Grupo GII, CAP1', CAP3', CAP4' e CAP5',

apresentaram áreas de endurecimento evidentes espalhadas por diferentes regiões do parênquima mamário. Em geral essas áreas, características de mastite causada por *S. agalactiae*, foram detectadas às 72h PI (M3) e persistiram até o M7. A fisiopatogenia da instalação do microrganismo na glândula mamária explica este achado. Sabe-se que *S. agalactiae* adentra a mama pelo canal do teto e a colonização da glândula é facilitada pela adesão na superfície epitelial dos seios glandulares. A multiplicação bacteriana local resulta em inflamação progressiva e fibrose. A liberação de substâncias quimiotáticas atrai leucócitos polimorfonucleares (PMNs) que fagocitam muitas bactérias invasoras. Outra importante parte de PMN é destruída, com liberação de enzimas lisossomais que causam lesão tecidual e inflamação, com formação de fibrina, que obstrui os pequenos ductos, levando à involução do tecido secretor, fibrose e agalaxia (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011).

Quanto à presença de grumos, estes foram constatados na secreção láctea de todos os tetos inoculados com *S. agalactiae* já no M1 quando o microrganismo também foi recuperado em culturas microbiológicas dessas amostras de leite. Com exceção da cabra CAP2', que cessou a liberação de grumos às 48h PI (M2), em duas cabras, CAP3' e CAP4', foi possível observar esta alteração no leite até o M6. Nas outras duas cabras restantes, CAP1' e CAP7', a presença de grumos manteve-se até o final do experimento (M7). Estes resultados corroboram os achados de Marogna et al. (2010), que relataram uma correlação positiva de 317% entre a presença de grumos no leite de ovelhas acometidas por mastite e resultados positivos na cultura bacteriológica.

Das cinco cabras que compuseram este grupo, duas, CAP2' e CAP5', não apresentaram alteração de comportamento ou sinal clínico sistêmico evidente; as outras três manifestaram sinais clínicos discretos, como inapetência e apatia transitórias. Lasagno et al. (2012) ao provocar mastite em cabras com a inoculação de *Streptococcus uberis* relatam que em quatro, de seis animais não foram observados sinais clínicos sistêmicos ou locais de mastite. Os autores atribuíram a escassez de sintomas à dose infectante utilizada, de $1,7 \times 10^8$ UFC de *S. uberis*, inferior à dose empregada neste estudo o que justificaria um quadro clínico um pouco mais evidente nas cabras do grupo GII.

Assim como as cabras CAP2' e CAP5', muitas vezes os sinais clínicos apresentados por animais com mastite foram discretos, sendo necessária uma avaliação exploratória atenta das cabras. Raramente isso é feito de forma correta na rotina prática de uma propriedade leiteira, fazendo com que casos subclínicos tornem-se crônicos e levem à disfunção da glândula mamária em longo prazo. Além da diminuição da vida útil produtiva da fêmea este descuido ocasiona baixa produtividade dessa cabra enquanto em lactação (TARIQ et al., 2014). Portanto, o exame da glândula mamária das cabras, bem como a avaliação qualitativa do leite, por meio de testes diários da caneca de fundo escuro e avaliações mensais do CMT, devem ser realizados rotineiramente e de forma minuciosa em cabras leiteiras. Vale salientar mais uma vez a cautela ao se interpretar o CMT na espécie caprina, como pode ser observado nos Apêndices I e II, onde há resultados positivos a este teste, mesmo em amostras lácteas oriundas dos tetos controle, os quais apresentaram-se negativos em todas as avaliações bacteriologias às quais foram submetidos.

Das cabras do grupo GII, a que apresentou sinais clínicos sistêmicos de mastite aguda, como apatia, inapetência e hipertermia, foi a cabra CAP1'. A fêmea, embora tenha sempre mantido o apetite, alimentando-se e ruminando bem, às 48h pós-inoculação (M2) apresentou apatia (Figura 10) e temperatura retal de 40,7°C. A partir desse momento manteve temperatura ao redor de 40,1°C até o final do estudo (M7), sem necessidade de intervenção terapêutica ao longo do experimento.



Figura 10. Cabra CAP1' submetida à inoculação intramamária com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae* (GII), apática às 48h (M2) após a inoculação.

Embora apresentando sinais sistêmicos mais evidentes, assim como as outras fêmeas do Grupo GII a cabra CAP1' desenvolveu mastite clínica às 24h PI (M1), com presença de alguns grumos no leite. A mastite manteve-se até o final do estudo. O teto controle permaneceu sadio, como foi constatado diariamente por meio do CMT e de culturas microbiológicas realizadas nas amostras de leite. Nas Figuras 11 e 12 é possível visualizar a progressão da infecção mamária neste animal com base nos testes da caneca de fundo escuro e do CMT.



Figura 11. Sequência de testes da caneca de fundo escuro na secreção láctea da cabra CAP1' (GII), inoculada com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae* no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

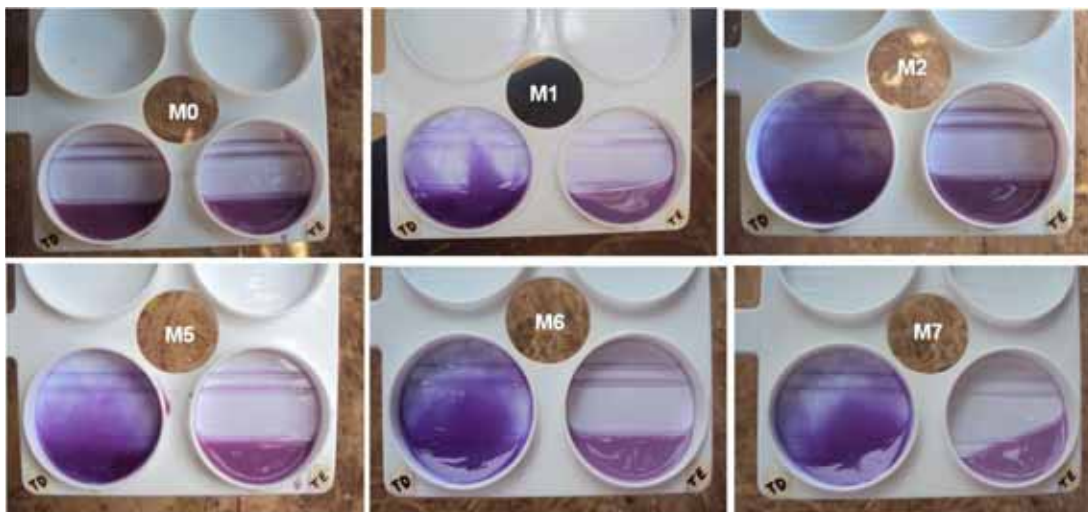


Figura 12. Sequência de *California Mastitis Test* na secreção láctea da cabra CAP1' (GII), apresentando reação negativa em ambos os tetos antes da inoculação (M0) e positiva no teto direito (TD) às 24h (M1), 48h (M2), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

As cabras CAP3' e CAP4' apresentaram discreta apatia em M1 e M2, respectivamente, embora, assim como a CAP1', essas cabras tenham mantido o apetite ao longo do estudo, alimentando-se e ruminando bem. Logo depois, em M4 e M3 respectivamente, as cabras CAP 3' e CAP 4' reassumiram a vivacidade típica da espécie. A cabra CAP 3' apresentou temperatura retal de 40,3°C às 24h PI (M1) e manteve uma média de 39,5°C do M2 ao M7. Esta média também foi constatada por Lasagno et al. (2012) nas primeiras 24h após a inoculação em duas de seis cabras com mastite induzida por *Streptococcus uberis*, que apresentavam sinais clínicos. Os autores relataram que os dois animais manifestaram apenas sintomas locais discretos de mastite, como leve sensibilidade e discreto edema à palpação, em concordância com os resultados obtidos nas cabras do Grupo GII neste estudo.

Ao final do período experimental, obteve-se o antibiograma em amostras de secreção láctea dos tetos, a fim de instituir a terapia intramamária apropriada. Para todas as amostras, o antibiótico ao qual a cepa de *S. agalactiae* mostrou maior sensibilidade foi a ciprofloxacina, corroborando relatos prévios de sensibilidade deste microrganismo a este antimicrobiano (BHATTACHARIA, 2002; KUMAR et al., 2010; 2013). A constatação da eficácia da terapia antimicrobiana intramamária realizada foi obtida por meio de culturas microbiológicas negativas seriadas.

4.2 Análise laboratorial das amostras de secreção láctea

4.2.1 Exames microbiológicos

Os resultados dos exames microbiológicos realizados com o intuito de verificar diariamente o sucesso da inoculação intramamária, foram satisfatórios ao longo de todo o estudo. As amostras de secreção láctea, oriundas dos tetos inoculados das cabras de ambos os grupos, apresentaram multiplicação bacteriana em placas de ágar sangue ovino desfibrinado 5% todos os dias, a partir da primeira avaliação, ou seja, 24h após a inoculação (M1). Não houve contaminação cruzada com outros microrganismos, sendo isolado apenas *S. aureus* nas cabras do Grupo GI (Figura 12), e *S. agalactiae* no grupo GII. Os tetos controles (teto esquerdo, TE) não apresentaram multiplicação bacteriana em nenhum momento do experimento.

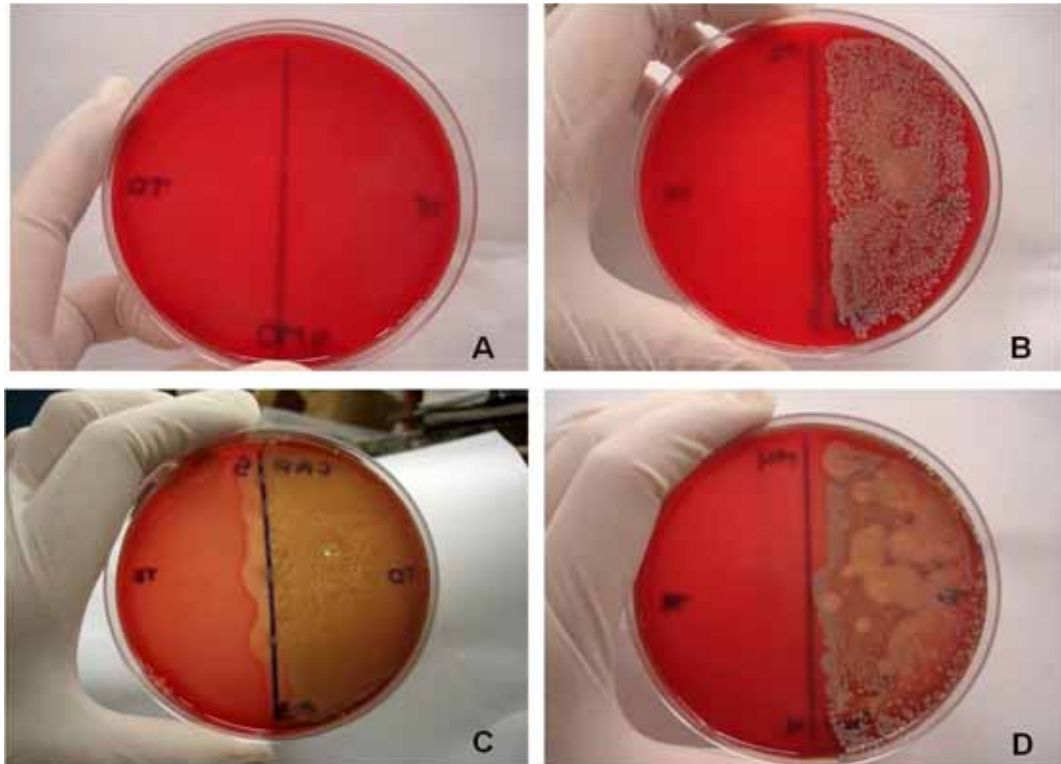


Figura 13. Exemplo de sequência de acompanhamento microbiológico em cabra do grupo G1. **A.** M0 (prévio à inoculação) sem multiplicação bacteriana; **B, C e D.** Multiplicação bacteriana com halo hemolítico característico de *Staphylococcus aureus* após inoculação no teto direito (metade direita da placa de Petri) e ausência de multiplicação bacteriana no teto esquerdo controle (metade esquerda da placa de Petri).

As colônias de *S. aureus* recuperadas eram características – convexas, de coloração branco-porcelana e apresentando halo de beta-hemólise. Já as colônias de *S. agalactiae* eram pequenas, puntiformes, brancas e também com halos de hemólise. A partir dessa identificação na placa de ágar sangue, as colônias suspeitas eram isoladas e submetidas à coloração de Gram e aos testes bioquímicos. A coloração de Gram revelou, como esperado, que as colônias suspeitas de *S. aureus* eram cocos Gram + em formação de “cachos” de cocos e as colônias suspeitas de *S. agalactiae* apresentavam-se, quando coradas, como cocos Gram + agrupados em fileiras. A diferenciação então seguiu sequência com a prova da catalase, pois os estafilococos são catalase positivos e os estreptococos negativos.

Uma vez confirmados os gêneros dos microrganismos, realizou-se a seguinte bateria de provas bioquímicas para os estafilococos: prova da coagulase, manitol, Voges-Proskauer e fermentação anaeróbia. Todas as amostras de secreção láctea analisadas foram positivas a estes testes, confirmando a presença exclusiva de *S. aureus* nos tetos inoculados. Já para o grupo GII, foi realizado o teste de CAMP, ao qual *S. agalactiae* é positivo. Todas as amostras obtidas nas colheitas diárias dos tetos inoculados das cabras do grupo GII foram positivas a esse teste.

4.3 Análise laboratorial das amostras de sangue

4.3.1 Leucograma

A contagem total de leucócitos em cabras do Grupo GI, mostrou-se desde o início do estudo um pouco mais elevada que os valores fisiológicos para a espécie caprina (WEISS e WARDROP, 2010) (Tabela 1). É possível observar em ruminantes um quadro de leucocitose fisiológica transitória, conhecido como leucograma de estresse, causado pela liberação de epinefrina frente a um estímulo estressante, como o parto (SAUT; BIRGEL JUNIOR, 2006). Em ovinos, já foi postulado que alterações observadas no leucograma de estresse pré-parto somente retornam à normalidade por volta do 14º dia após o parto (ANOSA; OGBOGU, 1979). Como as cabras do grupo GI foram inoculadas entre o 12º e o 15º dias pós-parto, é possível

que a elevação fisiológica da contagem total de leucócitos não tenha completado seu retorno aos valores de referência para a espécie.

À exceção da diminuição significativa na contagem de linfócitos, observada às 24h PI (M1) no Grupo GI, não se constatou alteração significativa nas contagens de nenhuma das células que compõem o leucograma (Tabela 1). Embora a avaliação da série branca seja considerada a parte mais útil do hemograma quando se trata do monitoramento de doenças infecciosas em ruminantes os valores do leucograma podem apresentar pouca ou nenhuma alteração, mesmo na infecção grave (BASTOS et al., 2011; COLE et al., 1997). Vale salientar que a contagem diferencial de leucócitos é mais importante que a contagem total, pois aumento ou diminuição de tipos celulares podem ocorrer simultaneamente, fazendo com que a contagem total permaneça inalterada (JONES; ALLISON, 2007).

Apesar de não significativa e dentro do limite de referência para a espécie (WEISS e WARDROP, 2010), observou-se diminuição biológica da contagem total de leucócitos das cabras do Grupo GI no M1 e M2, oscilando a partir daí em torno do valor observado inicialmente (Tabela 1). Esses resultados são diferentes daqueles relatados por Ajuwape et al. (2005), que avaliaram cabras com mastite de ocorrência natural de diferentes etiologias e constataram contagem total de leucócitos mais elevada no grupo enfermo quando comparado ao grupo saudável. A inflamação induzida na glândula mamária das cabras do grupo GI, apesar de clinicamente evidente, parece não ter sido suficiente para induzir leucocitose, quadro leucocitário esperado em doenças infecciosas (AJUWAPE et al., 2005; WEISS e WARDROP, 2010).

Ajuwape et al. (2005), constataram ainda diminuição do número de neutrófilos segmentados em animais enfermos em relação aos saudáveis, enquanto que neste estudo a contagem de segmentados manteve-se inalterada. A contagem de linfócitos mostrou diminuição significativa apenas no M1. Quanto à contagem absoluta de monócitos em ambos os estudos não foi constatada diferença significativa (Tabela 1). A média das contagens de neutrófilos bastonetes foi maior em M1 e M2, de 439 e 409 células/ μ L, respectivamente. Em seguida, regularizou-se, voltando a ser rara a visualização destas células. Este achado condiz com o

leucograma típico de ruminante durante a resposta de fase aguda, sendo comum a liberação de neutrófilos imaturos na circulação sanguínea para suprir a demanda de neutrófilos no sítio de injúria (JONES; ALLISON, 2007). A visualização de basófilos e/ou eosinófilos foi esporádica.

Quanto ao Grupo GII, em geral a contagem total de leucócitos também manteve-se um pouco maior do que àquela preconizada para caprinos (Tabela 2). Isso pode ser decorrente do fato de as fêmeas terem sido inoculadas entre o 12º e o 15º dia após o parto, não havendo tempo hábil para que a leucocitose transitória, comumente observada em leucogramas de estresse devido ao parto, retornasse aos valores normais para a espécie caprina (ANOSA; OGBOGU, 1979; SAUT; BIRGEL JÚNIOR, 2006; WEISS e WARDROP, 2010). Este raciocínio também embasaria o achado de diminuição significativa da média das contagens totais de leucócitos, de $15,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ no M0 para $10,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ no M1, indicando o retorno das contagens aos limites de referência fisiológica. A partir de M1 as contagens oscilaram ao longo do estudo.

Como já mencionado anteriormente, Bastos et al. (2011), relataram que o leucograma em ruminantes pode apresentar discretas alterações frente à processos infecciosos. Em concordância com essa afirmação, alterações sutis foram observadas nas contagens diferenciais do grupo GII, embora algumas tenham sido significativas (Tabela 2). Foi constatada diminuição significativa das contagens de neutrófilos segmentados às 72h PI (M2) e 96h PI (M4), em comparação com o momento controle (M0), embora dentro do limite de referência para a espécie (WEISS e WARDROP, 2010). Nos demais momentos houve apenas oscilações irrelevantes. A contagem de linfócitos diminuiu significativamente no M1. A partir daí, reassumiram valores observados inicialmente, oscilando ao longo do estudo (Tabela 2). Ocasionalmente foram observados basófilos, eosinófilos e neutrófilos bastonetes.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão das contagens de leucócitos (LE; $\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, Grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
LE	16,0 ± 4,02	13,2 ± 6,00	12,7 ± 5,62	14,2 ± 5,72	15,6 ± 3,62	16,0 ± 2,79	17,7 ± 4,05	16,2 ± 2,50
NS	5.835 ± 1.752	5.932 ± 3.400	4.557 ± 2.736	5.327 ± 3.220	6.171 ± 3.287	5.431 ± 1.620	8.674 ± 3.643	6.975 ± 1.417
LINF	9.577 ± 2.393	6.612 ± 3.210*	7.359 ± 2.701	8.325 ± 3.384	9.097 ± 1.505	10.066 ± 2.846	8.536 ± 2.885	8.853 ± 2.219
MON	227 ± 108	176 ± 94,4	214 ± 106	277 ± 244	131 ± 153	192 ± 182	216 ± 106	128 ± 127

*Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnet.

** Limites de referência para espécie caprina, segundo Weiss e Wardrop (2010): LE = 4 – 13; NS = 1.200 – 7.200; LINF.: 2.000 – 9.000; MON.: 0 – 550.

Tabela 2. Médias e desvio-padrão das contagens de leucócitos (LE; $\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
LE	15,5 ± 5,16	10,2 ± 6,45*	11,7 ± 5,63	12,7 ± 4,70	12,1 ± 6,54	12,7 ± 4,83	13,7 ± 7,68	14,7 ± 6,93
NS	5.401 ± 1.259	3.228 ± 2.181	2.454 ± 1.061*	3.589 ± 1.986	3.102 ± 2.036*	3.524 ± 2.514	3.888 ± 2.518	4.869 ± 2.429
LINF	9.808 ± 4.438	6.740 ± 4.383*	8.854 ± 4.717	8.882 ± 2.907	8.833 ± 4.942	8.265 ± 3.598	9.314 ± 5.413	9.624 ± 5.556
MON	180 ± 115	135 ± 53,4	176 ± 140	158 ± 93,4	122 ± 88,5	180 ± 35,2	201 ± 152	143 ± 177

*Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnet.

** Limites de referência para espécie caprina, segundo Weiss e Wardrop (2010): LE = 4 – 13; NS = 1.200 – 7.200; LINF.: 2.000 – 9.000; MON.: 0 – 550.

4.3.2 Perfil bioquímico sérico

4.3.2.1 Grupo inoculado com *Staphylococcus aureus* (GI)

No grupo GI não houve alteração significativa na concentração sérica de proteína total (PT), corroborando os achados de Patelli et al. (2008), que não observaram alteração na concentração sérica de PT em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanossoma evansi*. Também não foi verificada alteração significativa no teor sérico de albumina, globulinas, imunoglobulina G e transferrina (Tabela 3). Entretanto, embora discreto e estatisticamente não significativo, ressalta-se a tendência ao decréscimo do teor de albumina, em especial a partir do M5 até o M7. Além de a albumina ser uma proteína de fase aguda (PFA) negativa, que decresce sua concentração durante a resposta de fase aguda, este comportamento pode ser explicado pela mobilização de fluidos e proteínas para a glândula mamária, em função da inflamação induzida pela inoculação intramamária de *S. aureus* (FONTEQUE et al., 2010; CECILIANI et al., 2012; CRAY, 2012).

O teor sérico de globulinas apresentou discreta tendência à elevação, sem significância estatística, no M2 e M3, quando as cabras apresentaram sinais clínicos mais evidentes de mastite. Essa fração proteica contém, dentre outras, as PFA, cujos teores comumente se elevam durante a inflamação (KANEKO et al., 2008). Talvez em função desse equilíbrio entre a diminuição de uma fração e elevação de outra, não tenha sido possível detectar diferença na concentração sérica de PT, como relatado por Braun et al. (2010).

O teor plasmático de fibrinogênio (FP) elevou-se progressivamente a partir do M1, quando já foi observada a presença de grumos no leite da maioria das cabras, e com elevação significativa em relação ao M0 no M4 e M5, sendo o valor sérico máximo de 800 mg/dL obtido no M4. Essa proteína é a mais empregada para avaliação da reação de fase aguda em ruminantes, devido à facilidade de mensuração e rapidez na obtenção dos resultados, embora seja considerada uma PFA de resposta moderada em ruminantes (KANEKO et al., 2008). Em ovinos foi relatada como menos sensível (BRAUN et al., 2010) e em caprinos como sendo de baixa resposta à reação inflamatória (GONZÁLEZ et al. 2008). As cabras do grupo GI também apresentaram resposta discreta no teor de FP, sendo o maior percentual

de elevação detectado em M4, de 67% (Figura 14), ou seja, menos de 2x em relação ao M0. Esse resultado concorda ainda com a classificação sugerida por Eckersall e Bell (2010), na qual uma PFA de baixa resposta à inflamação se eleva gradualmente, em 50 a 100% em relação ao valor basal. Entretanto, embora mais discreto em relação à outras PFA avaliadas neste estudo, como será observado, ressalta-se o aumento significativo do fibrinogênio plasmático e a manutenção dos teores séricos elevados até o final do estudo, condizendo com o quadro de mastite clínica observado nas cabras até o M7.

Tabela 3. Médias e desvio-padrão das concentrações séricas de proteína total (PT), albumina (ALB), globulinas (GLB), imunoglobulina G (IgG) e transferrina (TRF) e concentração plasmática de fibrinogênio (FP), de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
PT** (g/dL)	7,57 ± 0,75	7,45 ± 0,23	7,76 ± 0,34	7,74 ± 0,73	7,54 ± 1,43	7,21 ± 1,36	7,13 ± 1,24	7,52 ± 0,71
ALB** (g/dL)	2,41 ± 0,09	2,39 ± 0,12	2,37 ± 0,10	2,19 ± 0,16	2,30 ± 0,25	2,21 ± 0,40	2,16 ± 0,41	2,19 ± 0,40
GLB** (g/dL)	5,16 ± 0,71	5,06 ± 0,31	5,39 ± 0,34	5,55 ± 0,70	5,23 ± 1,32	5,01 ± 1,03	4,97 ± 0,87	5,33 ± 0,52
IgG** (mg/dL)	2.012 ± 528	1.918 ± 513	2.042 ± 505	2.214 ± 559	2.097 ± 610	1.994 ± 624	1.977 ± 743	2.094 ± 441
TRF** (mg/dL)	449 ± 73	442 ± 80	429 ± 95	467 ± 43	454 ± 101	482 ± 87	456 ± 81	495 ± 88
FP** (mg/dL)	480 ± 130	580 ± 148	660 ± 279	700 ± 300	800 ± 324*	760 ± 288*	620 ± 303	560 ± 270

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnett.

** Limite de referência segundo Kaneko et al. (2008): PT= 6,4-7,0; Alb.= 2,70-3,90; Glob.= 2,70 - 4,10; IgG= referência é o próprio animal; TRF= referência é o próprio animal; FP= 100-400.

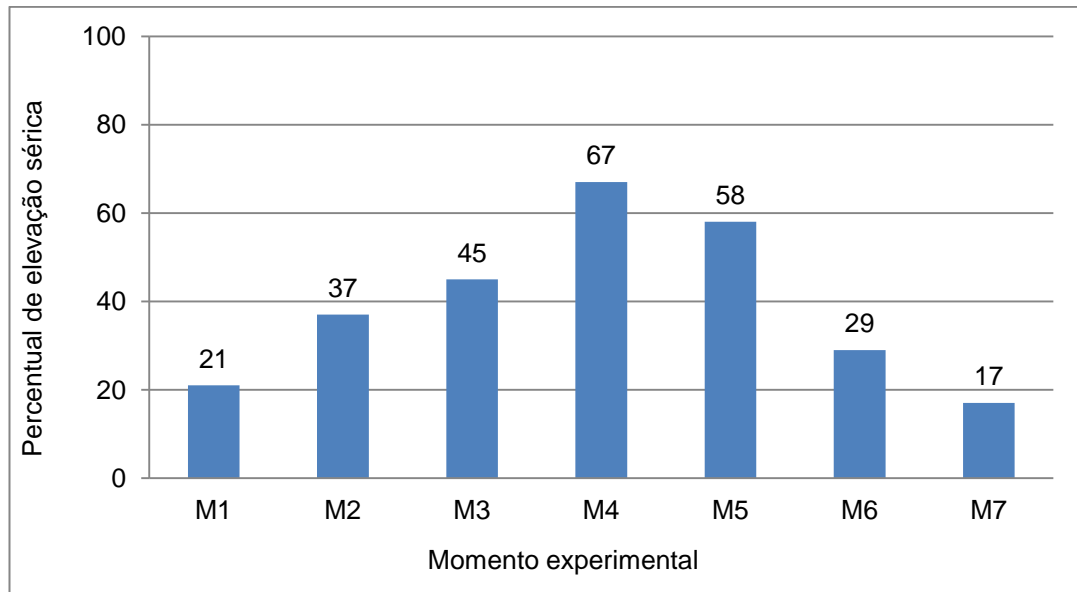


Figura 14. Percentual de elevação nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio em cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

Os valores obtidos para aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT), creatina quinase (CK), ureia, creatinina, cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe), não apresentaram diferença significativa em relação ao momento basal (Tabela 4). Ainda que sem significância estatística, as atividades séricas de AST, ALP e CK apresentaram tendência à elevação a partir de M4, M6 e M3, respectivamente, mantendo essa tendência até o M7. Em ruminantes é comum que se faça a associação entre AST, ALP e GGT para confirmar lesão hepática, enquanto que as mensurações de AST e CK são indicadas para avaliação de lesão muscular (KANEKO et al., 2008; BRAUN et al, 2010). Nas cabras do grupo GI, notaram-se graus variáveis de lesão no tecido mamário. Na cabra CAP5 ocorreu destruição do tecido mamário com posterior perda da mama, e nas outras fêmeas, embora não tenha sido um parâmetro quantificado, foi observado

o desenvolvimento de nodulações de tamanhos e localizações diversas no parênquima mamário. Isso pode justificar as elevações de AST, ALP e CK.

A função renal dos animais do Grupo GI mostrou-se discretamente alterada em M4 e M5, com base nas concentrações séricas de ureia e creatinina (Tabela 4). Embora sem alteração significativa em relação ao M0, há de se ter em conta a elevação biológica observada no teor sérico de ureia do M5 ao M7 e no teor sérico de creatinina em M4 e M5, além da faixa de normalidade estabelecida para a espécie caprina (KANEKO et al., 2008). Insuficiência renal não é uma ocorrência comum em ruminantes e provavelmente por essa razão a taxa de filtração glomerular não tenha sido estudada em maiores detalhes nestes animais (BRAUN et al., 2010). Literatura correlata acerca da função renal de vacas, ovelhas e, em especial de cabras, acometidas por mastite é praticamente inexistente, não tendo sido encontrado nenhum estudo acerca do assunto. No entanto, é possível que as concentrações séricas destes dois parâmetros de função renal tenham sido afetados pela moderada desidratação que se desenvolveu nas cabras CAP3 e CAP5, já que a partir do M2, foi observada apatia, inapetência e diminuição da ingestão de água.

Nas cabras do grupo GI, não se constatou alteração significativa nos teores séricos de cálcio, fósforo, magnésio e ferro ao longo do estudo (Tabela 4), corroborando os achados de Ibtisam El Zubeir et al. (2005), que avaliaram a influência da mastite na concentração sérica de minerais em vacas sem constatação de alterações significativas. Como relatado por Wegner e Stull (1978), isso pode ser decorrência dos mecanismos homeostáticos suficientemente dinâmicos para responder à transferência de minerais do sangue para a glândula mamária como pode acontecer na mastite. Outra possibilidade é que a quantidade de minerais que extravasa para a secreção láctea da mama doente é tão baixa que é irrelevante em relação ao conteúdo total no sangue, uma vez que há redução na produção de leite na glândula mamária infectada. Similarmente, Erskine e Bartlett (1993), avaliando as concentrações séricas de minerais em vacas com mastite induzida por via intramamária com *Escherichia coli*, concluíram que as alterações no perfil de oligoelementos provavelmente ocorrem em um estágio mais tardio da infecção. Ainda em relação ao teor de minerais em cabras do grupo GI, vale

ressaltar a tendência à diminuição do teor sérico de Fe, ainda que seja estatisticamente não significativa. Tendo-se em mente que *S. aureus* é um microrganismo com alta afinidade pelo Fe, o sistema imune, como uma forma de impedir a colonização e multiplicação da bactéria, tende a indisponibilizar o mineral, ligando-o a proteínas, como a ferritina (DIARRA et al, 2002; TIZARD, 2002). Esse fato poderia justificar a tendência ao decréscimo observada no teor de Fe no grupo GI, das 24h (M1) às 96h PI (M4) em relação ao M0.

Tabela 4. Médias e desvio-padrão das atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK), e das concentrações séricas de ureia, creatinina (Creat), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
AST** (U/L)	78,6 ± 11,7	78,6 ± 11,1	73,3 ± 12,3	80,7 ± 28,8	177 ± 247	183 ± 272	187 ± 271	158 ± 211
ALP** (U/L)	54,7 ± 12,6	48,1 ± 16,0	41,5 ± 19,4	33,2 ± 18,5	48,1 ± 30,1	68,0 ± 54,8	82,9 ± 72,0	81,3 ± 69,7
GGT** (U/L)	41,3 ± 8,7	42,8 ± 10,3	41,3 ± 11,6	39,8 ± 10,0	38,3 ± 9,4	33,7 ± 8,7	35,2 ± 8,7	33,7 ± 6,8
CK** (U/L)	189 ± 67,7	157 ± 55,7	162 ± 48,3	650 ± 1.037	805 ± 1.345	1.212 ± 2.033	547 ± 835	251 ± 187
Ureia** (mg/dL)	14,2 ± 6,6	21,2 ± 11,7	19,9 ± 9,6	41,4 ± 40,0	18,4 ± 6,1	61,6 ± 82,0	54,8 ± 77,0	51,6 ± 75,3
Creat** (mg/dL)	1,42 ± 0,63	1,16 ± 0,33	1,08 ± 0,29	1,53 ± 1,32	2,00 ± 2,33	1,80 ± 1,99	1,30 ± 1,02	1,22 ± 0,62
Ca** (mg/dL)	7,48 ± 0,94	7,40 ± 0,64	7,07 ± 0,88	6,99 ± 0,44	7,06 ± 0,63	7,31 ± 0,79	7,13 ± 1,72	6,95 ± 1,53
P** (mg/dL)	6,37 ± 1,11	7,79 ± 3,81	5,32 ± 2,25	6,26 ± 2,52	6,36 ± 1,51	6,27 ± 2,41	6,72 ± 2,77	6,66 ± 2,32
Mg** (mg/dL)	3,11 ± 0,61	2,74 ± 0,28	2,81 ± 0,52	2,69 ± 0,29	2,85 ± 0,60	2,65 ± 0,17	2,55 ± 0,38	2,76 ± 0,36
Fe** (µg/dL)	191 ± 66,7	122 ± 80,2	154 ± 73,8	146 ± 87,0	165 ± 76,7	193 ± 106	160 ± 28,6	191 ± 32,6

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnett.

** Limite de referência segundo Kaneko et al.(2008): AST = 167–513; ALP= 93–387; GGT= 20–56; CK= 0,8–8,9; Ureia= 21,4–42,8; Creat.: 1–1,8; Ca= 8,9–11,7; P= 4,2–9,1; Mg= 2,8–3,6; Fe= 130–250.

4.3.2.2 Grupo inoculado com *Streptococcus agalactiae* (GII)

Não se constatou alteração significativa nas concentrações séricas de proteína total e de globulinas. O teor sérico albumina diminuiu significativamente a partir de M5 (Tabela 5), ainda que sem importância clínica e que em nenhum momento tenha se apresentado abaixo do limite de referência para caprinos (KANEKO et al., 2008).

As concentrações séricas de imunoglobulina G (IgG) e de transferrina não apresentaram alterações significativas, ao contrário da concentração plasmática de fibrinogênio (FP) que elevou-se significativamente em todos os momentos após a inoculação (Tabela 5). O teor máximo de fibrinogênio foi constatado às 120h PI (M5). Resultado semelhante foi obtido por Costa et al. (2010) em ovelhas com mastite induzida por *S. aureus*, nas quais o pico de concentração foi observado às 132h PI. Esse valor máximo de fibrinogênio nas cabras do grupo GII correspondeu a aumento de 2,3 vezes em relação ao valor basal, ou seja, um percentual de elevação de 129% em relação ao M0 (Figura 15). Essa proteína é considerada uma PFA de resposta discreta a moderada em bovinos, com elevação de 2 a 3 vezes em resposta a inflamação/infecção (PETERSEN et al., 2004; DANSCHER et al., 2011), como se verificou nas cabras do Grupo GII.

Os resultados obtidos também corroboram os relatos de Cole et al. (1997), os quais afirmaram que a concentração de fibrinogênio tende a se manter elevada durante a doença ativa e até que a demanda não exceda a capacidade de produção hepática. Em geral, o teor de fibrinogênio retorna à normalidade dentro de alguns dias, após a cessação da destruição tissular ativa, seguido de contínua elevação nas concentrações de gamaglobulinas, caracterizando assim o processo crônico. A IgG corresponde a cerca de 85% do total de gamaglobulinas e como a mastite induzida foi avaliada na fase aguda da enfermidade, a ausência de alteração significativa na concentração de IgG é compatível com os relatos na literatura.

Os valores obtidos para transferrina, uma PFA negativa (GONZÁLEZ et al., 2008; CECILIANI et al., 2012; CRAY, 2012), embora não tenham mostrado alteração significativa, apresentaram discreta diminuição em relação ao M0 a partir do M4. Depois disso, essa tendência de decréscimo persistiu até o M7.

Tabela 5. Médias e desvio-padrão das concentrações séricas de proteína total (PT), albumina (ALB), globulinas (GLB), imunoglobulina G (IgG) e transferrina (TRF) e concentração plasmática de fibrinogênio (FP) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
PT (g/dL)	7,15 ± 0,88	7,67 ± 0,88	7,02 ± 0,59	7,92 ± 1,47	7,11 ± 0,44	6,83 ± 0,21	6,83 ± 0,39	6,97 ± 0,29
ALB (g/dL)	2,44 ± 0,54	2,31 ± 0,50	2,27 ± 0,35	2,27 ± 0,35	2,22 ± 0,30	2,14 ± 0,29*	2,10 ± 0,20*	2,09 ± 0,22*
GLB (g/dL)	5,60 ± 2,46	5,36 ± 1,17	4,76 ± 0,82	5,66 ± 1,66	4,89 ± 0,65	4,69 ± 0,40	4,73 ± 0,49	4,88 ± 0,46
IgG (mg/dL)	1.608 ± 281	1.712 ± 394	1.643 ± 385	1.760 ± 469	1.609 ± 395	1.651 ± 349	1.595 ± 379	1.677 ± 365
TRF (mg/dL)	500 ± 93,52	594 ± 134	509 ± 91,63	556 ± 99,14	480 ± 102	462 ± 95,56	454 ± 55,72	448 ± 77,85
FP (mg/dL)	340 ± 152	640 ± 152*	640 ± 167*	620 ± 148*	720 ± 192*	780 ± 370*	720 ± 179*	720 ± 277*

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnett.

** Limite de referência segundo Kaneko et al. (2008): PT= 6,4-7,0; Alb.= 2,70-3,90; Glob.= 2,70 - 4,10; IgG= referência é o próprio animal; TRF= referência é o próprio animal; FP= 100-400.

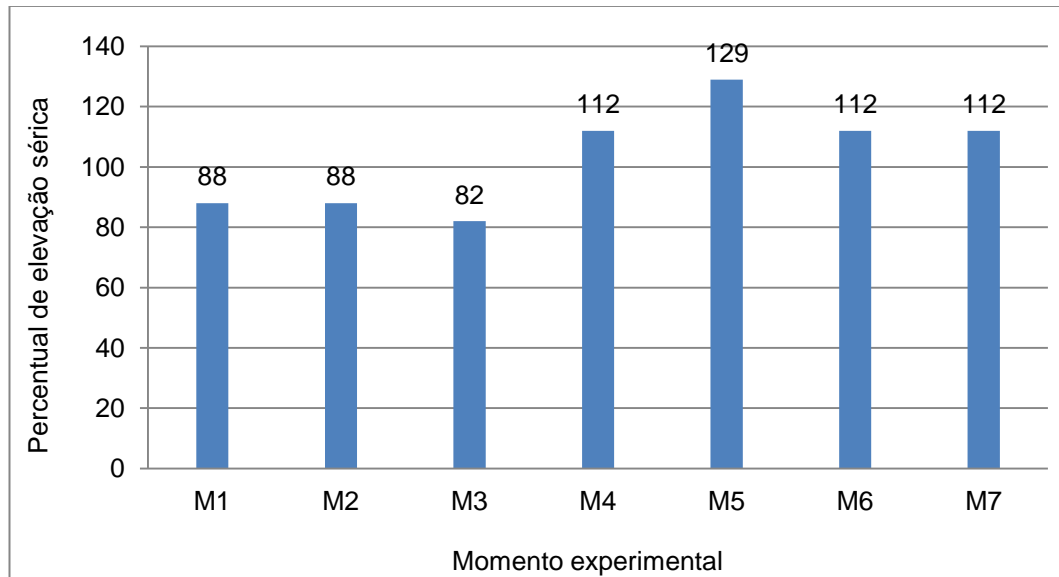


Figura 15. Percentual de elevação nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

Nos animais do grupo GII não foram constatadas alterações significativas nas atividades de GGT e CK. A enzima AST tendeu a decréscimo progressivo após a inoculação, até o M4, quando foi constatada diminuição significativa, que persistiu nos momentos subsequentes, até M7. A enzima ALP apresentou comportamento semelhante, porém o decréscimo significativo de sua atividade sérica só foi constatado no penúltimo dia do estudo, M6 (Tabela 6). Apesar da diferença significativa em relação ao M0, ressalta-se que todos os valores obtidos para AST e ALP ao longo do período experimental foram abaixo dos valores considerados como referência para a espécie caprina (KANEKO et al., 2008). Isso ressalta, mais uma vez, observações feitas em trabalhos prévios sobre a necessidade se ter em conta fatores diversos, inclusive ambientais, os quais podem influenciar os resultados e assim, reforça a vantagem de se usar o próprio animal como controle de si mesmo (BRAUN et al., 2010; POLIZOPOULOU, 2010).

Constatou-se que a concentração sérica de creatinina foi significativamente menor em M3, M4 e M6, em relação ao M0, embora este achado não tenha

mostrado relevância clínica. Da mesma forma, não houve alteração significativa na concentração sérica de ureia (Tabela 6). Em nenhum momento as cabras do Grupo GII apresentaram qualquer sinal clínico que indicasse alteração da função renal.

Não se verificou alteração significativa nos teores de cálcio, fósforo e magnésio, apenas oscilações ao longo do estudo (Tabela 6). Ao contrário disso, em estudo com mastite em cabras induzida por doses infectantes variadas de *S. aureus*, Ma et al. (2007), observaram elevação significativa do teor plasmático de Mg em todos os grupos doentes. No entanto, também notaram que quanto maior a dose do inóculo de *S. aureus* menos expressivo foi o aumento no teor de Mg.

Nas cabras do Grupo GII, o teor de ferro diminuiu progressivamente após a inoculação, atingindo decréscimo significativo em relação ao momento basal às 96h PI, M4 (Tabela 6). Embora após o M4 tenha havido tendência à elevação, até o final do estudo o teor deste mineral ainda não havia retornado ao valor observado em M0. A capacidade de aquisição de ferro por microrganismos foi relacionada a sua habilidade em produzir e utilizar sideróforos, e isso tem sido frequentemente ligado à virulência de certas bactérias patogênicas (DIARRA et al., 2002). WEINBERG (1978) ressalta que na competição entre o estabelecimento da infecção bacteriana e a supressão bem sucedida da doença por parte do hospedeiro, o ferro é o mineral que parece ser o mais importante.

Tabela 6. Médias e desvio-padrão das atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK) e concentrações séricas de ureia, creatinina (Creat), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
AST** (U/L)	91,13 ± 15,96	89,05 ± 15,27	83,81 ± 15,27	79,62 ± 18,66	73,33 ± 11,71*	68,09 ± 12,83*	70,19 ± 9,51*	61,81 ± 21,72*
ALP** (U/L)	76,30 ± 47,43	69,66 ± 31,91	53,07 ± 31,36	56,38 ± 34,39	49,75 ± 32,64	53,07 ± 40,03	48,09 ± 34,39*	46,43 ± 26,61*
GGT** (U/L)	42,84 ± 8,72	41,31 ± 11,60	42,84 ± 8,72	45,90 ± 5,41	42,84 ± 6,84	44,37 ± 6,40	44,37 ± 6,40	45,90 ± 5,41
CK** (U/L)	180 ± 36,74	174 ± 13,42	162 ± 26,83	150 ± 21,21	138 ± 26,88	156 ± 83,21	126 ± 25,11	150 ± 56,13
Ureia** (mg/dL)	25,96 ± 10,20	33,83 ± 10,12	25,66 ± 8,71	24,49 ± 9,06	24,20 ± 10,29	19,68 ± 5,08	22,89 ± 11,74	22,89 ± 11,17
Creat** (mg/dL)	0,84 ± 0,10	0,89 ± 0,13	0,73 ± 0,15	0,69 ± 0,04*	0,68 ± 0,10*	0,72 ± 0,02	0,68 ± 0,08*	0,76 ± 0,07
Ca** (mg/dL)	8,39 ± 0,99	7,81 ± 0,44	7,72 ± 0,57	7,70 ± 0,17	8,06 ± 0,47	7,89 ± 0,32	8,07 ± 0,79	8,07 ± 0,82
P** (mg/dL)	5,41 ± 1,53	6,93 ± 2,13	4,85 ± 1,95	3,66 ± 0,49	4,82 ± 1,42	5,21 ± 1,69	4,84 ± 1,85	4,04 ± 1,54
Mg** (mg/dL)	2,37 ± 0,69	2,33 ± 0,10	2,37 ± 0,32	2,69 ± 0,21	2,41 ± 0,47	2,36 ± 0,25	2,26 ± 0,28	2,14 ± 0,58
Fe** (µg/dL)	178 ± 28,56	75,84 ± 9,79*	101 ± 26,72*	129 ± 40,98	81,83 ± 75,18*	90,91 ± 23,58*	103 ± 34,47*	122 ± 21,71

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao momento basal (M0) pelo teste de Dunnet.

** Limite de referência segundo Kaneko et al.(2008): AST = 167-513; ALP= 93-387;

GGT= 20-56; CK= 0,8-8,9; Ureia= 21,4-42,8; Creat.: 1-1,8; Ca= 8,9-11,7; P= 4,2-9,1; Mg= 2,8-3,6; Fe= 130-250.

4.3.3 Eletroforese SDS-PAGE

4.3.3.1 Grupo inoculado com *Staphylococcus aureus* (G1)

O proteinograma sérico obtido por meio da eletroforese bidimensional em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) revelou em média 22 proteínas com pesos moleculares de 23 a 217 kDa. Destas, no estudo são abordadas três proteínas de fase aguda (PFA), ou seja, ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida, em função de sua importância clínica em ruminantes. Como afirmaram Ceciliani et al. (2012), um dos principais potenciais de aplicação da mensuração de PFA, embora sejam marcadores inespecíficos, é na detecção e monitoramento de mastite. Apesar dos vários estudos em andamento com esse grupo de proteínas, especialmente na espécie bovina, pouca informação concreta foi obtida em relação à sua exata atuação na mastite, particularmente na espécie caprina (THULASIRAMAN et al., 2013).

Ceruloplasmina

A utilização da ceruloplasmina como marcador de inflamação não é tão comum quanto o uso de outras PFA, como a haptoglobina (MURATA et al., 2004; COSTA et al., 2010). Na literatura consultada, foram encontrados apenas dois trabalhos que avaliaram a ceruloplasmina em enfermidades na espécie caprina (COSTA et al., 2010; SIMPLÍCIO, 2011).

Costa et al. (2010), ao estudarem ovelhas com mastite induzida por *S. aureus*, observaram que os maiores teores séricos de ceruloplasmina coincidiram com a maior gravidade do quadro clínico de mastite, concordando com o constatado nas cabras do grupo G1, entre o M2 e M3. Ao contrário de Fontequé et al. (2010), que não observaram, após inoculação intramamária com *S. aureus* em cabras, elevação significativa da fração α -globulina, que contém, dentre outras PFA a ceruloplasmina, no grupo G1 foi observado percentual de aumento de até 254% (M3) no teor sérico dessa proteína (Tabelas 7 e 8 e Figura 16). Isso pode decorrer de os autores terem usado uma dose infectante bem inferior, de 500 UFC de *S. aureus*, à utilizada neste estudo.

Pfeffer et al. (1993), estudando ovinos com pneumonia induzida constataram que a ceruloplasmina, dentre as três PFA avaliadas, ceruloplasmina, fibrinogênio e haptoglobina, mostrou ser o melhor biomarcador da reação inflamatória nesta espécie. Esse resultado não concorda com o observado nas cabras do grupo GI (Tabela 7 e Figura 16). No entanto, apesar de não ter sido a PFA mais responsiva dentre as avaliadas no grupo GI, foi identificado aumento considerável da concentração de ceruloplasmina em relação ao M0. Ressalta-se mais uma vez o percentual de elevação de 254% constatado no M3. Da mesma forma, Fagliari et al. (2003) relataram elevação nas concentrações dessa proteína em bezerras com pneumonia experimentalmente induzida por *Mannheimia haemolytica*, Ulutas e Ozpinar (2006) verificou o mesmo em ovinos com pasteurelose induzida e Fagliari et al. (2007) em casos naturais de fotossensibilização.

Haptoglobina

A elevação da concentração sérica de haptoglobina foi precoce (Tabela 8) e os percentuais de elevação foram consideráveis (Tabela 7 e Figura 16), corroborando relatos prévios sobre a alta sensibilidade dessa proteína na detecção de doenças inflamatórias e/ou infecciosas em ruminantes, chegando a 100 vezes mais do que seu valor normal (MURATA et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2008; DJEBABRI, 2010; ECKERSALL; BELL, 2010; BENDIXEN et al., 2011; CECILIANI et al., 2012; THULASIRAMAN et al., 2013). Skinner e Roberts (1994), num estudo com ovelhas, confirmaram que a haptoglobina foi um melhor indicador de infecção bacteriana que o leucograma. González et al. (2008) verificaram teor sérico máximo de haptoglobina em cabras com processo inflamatório induzido pela injeção subcutânea de terebintina às 72h PI. Nas cabras do grupo GI o aumento da concentração de haptoglobina foi precoce e evidente logo às 24h PI (M1), com valor máximo às 48h PI (M2), quando foi constatado percentual de aumento de 444% (Tabela 7 e Figura 16). Esses dados estão em concordância com os relatados por Cole et al. (1997) e González et al. (2007), que ressaltaram, inclusive, a possibilidade de detecção de animais infectados antes que manifestem sinais clínicos.

Aumentos relevantes nos teores de haptoglobina foram também registrados por Ohtsuka et al. (2001), ao estudar a resposta de fase aguda em vacas acometidas por mastite de ocorrência natural, e por Colla et al. (2009) ao pesquisarem o valor diagnóstico da haptoglobina em casos de mastite subclínica em vacas leiteiras. Ambos os trabalhos ressaltaram a correlação positiva entre a gravidade da lesão e os teores séricos da proteína, assim como Singh e Pachauri (2002) que descreveram a relação direta entre a concentração plasmática de haptoglobina e a extensão da lesão no tecido mamário. No grupo GI, a maior gravidade dos sinais clínicos de mastite foi constatada às 48h e 72h PI, ou seja, em M2 e M3, coincidindo com os teores séricos mais elevados de haptoglobina durante o estudo. Esses achados concordam com os relatos de vários autores que já demonstraram uma correlação positiva entre a severidade dos sinais clínicos de mastite e a concentração sérica de haptoglobina (SPOONER; MILLER, 1971; CONNER et al., 1988; HEEGAARD et al., 2000).

Dentre as PFA positivas avaliadas no grupo GI, a haptoglobina foi a que mostrou melhor resposta à reação inflamatória e precocidade, concordando com os achados de González et al. (2008), em estudo com indução de inflamação em cabras submetidas à administração subcutânea de terebintina e Simplício (2011), que avaliou o teor de haptoglobina em cabras com mastite estafilocócica de ocorrência natural. No entanto, os resultados discordam dos relatos de Fontequé et al. (2010), pois enquanto nas cabras do grupo GI se constatou percentual de aumento de até 440% no teor sérico de haptoglobina, aqueles autores não observaram, após inoculação intramamária de *S. aureus* em cabras, elevação da fração α -globulina, a qual contém, dentre outras PFA, a haptoglobina. Isso pode ser decorrência da dose infectante utilizada, de 500 UFC de *S. aureus*, bem inferior à utilizada no grupo GI, de $9,5 \times 10^9$ UFC de *S. aureus*. Nielsen et al. (2004) também verificaram concentrações aumentadas de haptoglobina em vacas com mastite clínica e citaram esta proteína como uma das principais PFA na espécie bovina. Suojala et al. (2008), em estudo com infecção experimental por *E. coli*, observaram valor máximo de haptoglobina entre 60h e 68h após a inoculação, enquanto no presente estudo este pico foi verificado em cabras do grupo GI às 48h PI.

Apesar do potencial da haptoglobina como biomarcador inespecífico na espécie caprina, ainda são escassos os trabalhos a ela relacionados. A maior parte das informações obtidas na literatura é baseada em estudos com mastite em vacas; nesta espécie animal, a haptoglobina é considerada ótimo indicador de inflamação (DJEABRI, 2010; ECKERSALL; BELL, 2010; CRAY, 2012). Ainda, González et al. (2008) ressaltaram que apesar da relevância clínica que as PFA possam ter na caprinocultura, até o momento são escassas as pesquisas acerca do tema na espécie caprina.

α_1 -Glicoproteína ácida

Quanto à α_1 -glicoproteína ácida não foi observada resposta precoce à inflamação nas cabras do grupo GI, embora tenha sido constatada tendência à elevação em sua concentração, particularmente a partir das 144h PI (M6) (Tabela 8). O teor sérico máximo foi detectado no último momento do estudo (M7), correspondendo a um percentual de elevação de 83% (Tabela 7 e Figura 16). Essa resposta retardada da α_1 -glicoproteína ácida, quando comparada às outras PFA avaliadas, aponta que talvez essa PFA seja mais indicativa de processos crônicos em vez de agudos. Essa caracterização de cronicidade pela α_1 -glicoproteína ácida já foi sugerida em estudo com ovelha com linfadenite caseosa experimental, com cabras submetidas à administração subcutânea de terebintina e com bovinos ao se comparar reações inflamatórias agudas e crônicas (ALSEMGEEST et al., 1995; ECKERSALL et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008).

Ainda, o aumento da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida nas cabras do grupo GI, além de tardio foi mais discreto, concordando com relatos prévios envolvendo essa proteína em estudos com bovinos portadores de inflamação experimental, em vacas com mastite clínica aguda ou com leucose bovina ou naquelas submetidas à cirurgia, em cabras após a injeção de terebintina e em ovelhas com mastite induzida por *S. aureus* (CONNER et al., 1988; NAGAHATA et al., 1989; GONZÁLEZ et al., 2008; COSTA et al., 2010). Ademais, vários autores, ressaltam o fato de que a concentração sérica desta proteína se mantém elevada

por longo tempo (ECKERSALL et al., 2001; FAGLIARI et al., 2003). Regassa et al. (2002), estudando ovelhas com metrite induzida, verificaram teores elevados de α_1 -glicoproteína ácida por até duas semanas após a infecção.

Tabela 7. Percentual de elevação sérica, em %, de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Glic. Ác.) em cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Ceruloplasmina	50,10	144,5	253,8	185,2	210,7	205,8	113,8
Haptoglobina	143,7	443,96	225,3	205,6	147,8	91,10	70,30
Glic. Ác.	12,70	35,43	42,90	45,63	30,06	72,70	83,77

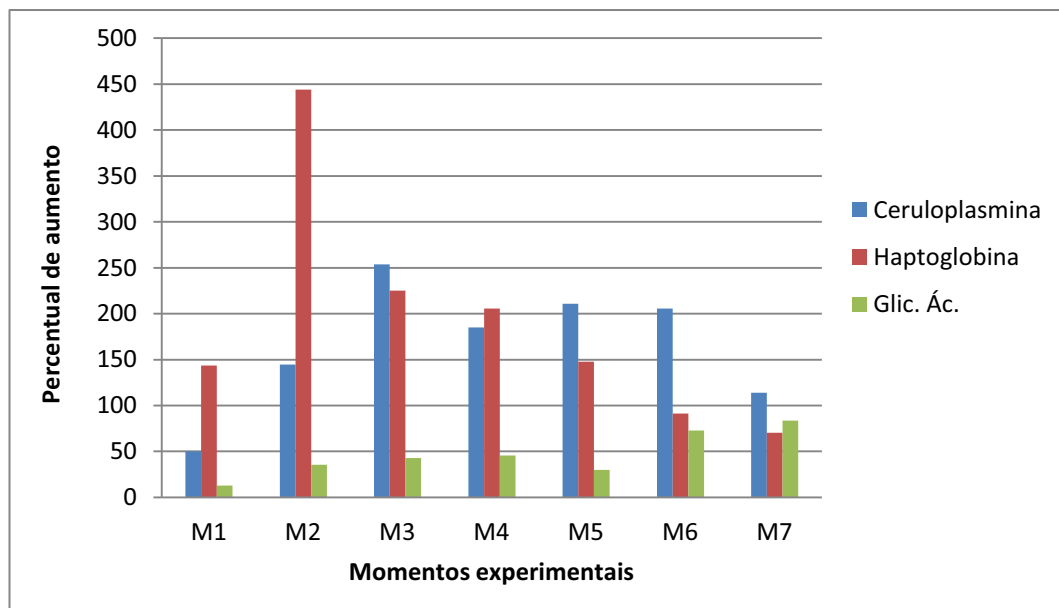


Figura 16. Percentual de elevação das concentrações séricas de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Glic. Ác.) em cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

Tabela 8. Concentrações séricas de ceruloplasmina (CER), haptoglobina (HAP) e α_1 -glicoproteína ácida (G.ÁC.) de cabras inoculadas com $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus*, grupo GI, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)	Média (LI – LS)
CER	17,8 (3,58 – 43,5)	28,0 (15,3 – 52,4)	34,6 (15,9 – 50,4)	47,1 (18,4 – 86,1)	40,4 (7,24 – 70,4)	37,6 (6,17 – 76,0)	30,6 (6,75 – 77,6)	21,5 (10,7 – 46,7)
HAP	73,2 (10,7 – 206)	102 (24,8 – 250)	197 (83,5 – 403)	188 (13,5 – 490)	179 (20,7 – 481)	140 (5,0 – 379)	102 (5,84 – 264)	85,2 (7,48 – 228)
G.ÁC.	17,8 (16,9 – 19,2)	16,5 (9,2 – 27,4)	17,2 (3,05 – 41,1)	18,4 (0 – 46,2)	20,3 (4,35 – 48,0)	18,2 (0 – 36,2)	26,2 (6,96 – 66,4)	27,5 (5,22 – 73,9)

LI: Limite inferior

LS: Limite superior

4.3.3.2 Grupo inoculado com *Streptococcus agalactiae* (GII)

O proteinograma sérico obtido pela técnica de eletroforese SDS-PAGE, revelou em média 23 proteínas nas cabras do grupo GII, com pesos moleculares de 22 a 225 kDa. Destas, são abordadas três proteínas de fase aguda (PFA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida, em função de sua importância clínica.

Ceruloplasmina

Como mencionado anteriormente, a literatura consultada revelou apenas dois trabalhos envolvendo o estudo de ceruloplasmina em enfermidades na espécie caprina, reforçando os relatos de Eckersall (2006) e Murata et al. (2004) de que há poucos estudos com PFA em ruminantes que não sejam da espécie bovina e que a utilização de ceruloplasmina como marcador de inflamação é menos comum em comparação à outras PFA.

Nas cabras do grupo GII, notou-se aumento progressivo do teor sérico de ceruloplasmina após a inoculação intramamária com *S. agalactiae* (Tabela 10). O valor máximo foi detectado às 120h PI (M5), com percentual de elevação de 112% em relação ao momento basal (Tabela 9 e Figura 17). No entanto, este teor máximo observado foi inferior ao relatado em cabras acometidas por mastite estafilocócica de ocorrência natural, ou em ovelhas com mastite estafilocócica experimental (COSTA et al., 2010; SIMPLÍCIO, 2011), aumentos estes de 9 e 6 vezes respectivamente, contra 3,5 vezes, observado nas cabras do grupo GII. Esse fato pode ser decorrente da diferença de estímulo antigênico pelas diferentes bactérias. Em geral, *Staphylococcus aureus*, por seu caráter mais invasivo, tende a promover respostas sistêmicas mais evidentes. Por outro lado, *S. agalactiae*, que geralmente invade as células da superfície epitelial, promove respostas mais localizadas à mama. Ainda, com base na classificação proposta por Eckersall e Bell (2010), ceruloplasmina seria uma PFA de menor importância na avaliação de mastite

estreptocócica em cabras, por responder gradualmente à infecção e apresentar elevação entre 50% e 100% em relação ao nível basal.

Haptoglobina

Costa et al. (2010), estudando ovelhas com mastite induzida com *S. aureus*, constataram elevação no teor sérico de haptoglobina nas primeiras 24h PI, com valor máximo de 175,74 mg/dL às 180h PI, um aumento de 14 vezes em relação ao momento controle. Estes resultados assemelham-se ao observado nas cabras do grupo GII (Tabela 9 e Figura 17), no qual também foi constatada elevação considerável às 24h PI (M1), sendo o valor máximo de concentração verificado às 168h PI (M7), equivalendo a um aumento de 27 vezes, ou seja, um percentual de elevação de 2.500% (Figura 14).

Com base no sistema de classificação de importância clínica das PFA estabelecido por Eckersall e Bell (2010), a haptoglobina foi uma PFA de ótima resposta à mastite estreptocócica experimental na espécie caprina, elevando-se, como já mencionado, em 2.500% em relação ao M0. González et al. (2008), ao avaliarem a resposta de fase aguda em cabras com processo inflamatório induzido pela injeção subcutânea de terebintina, observaram que a haptoglobina foi a PFA com maior percentual de elevação dentre as PFA avaliadas, concordando com os resultados obtidos no grupo GII.

α_1 -Glicoproteína ácida

A concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida não apresentou alterações relevantes ao longo do estudo nas cabras do grupo GII (Figura 14), corroborando os achados de Costa et al. (2010) que também não constataram alterações no teor sérico dessa proteína em ovelhas acometidas por mastite induzida. Na verdade, observou-se tendência ao decréscimo na concentração sérica de α_1 -glicoproteína

ácida nas cabras do grupo GII nos últimos momentos experimentais (Tabelas 9 e 10 e Figura 17).

Tabela 9. Percentual de elevação sérica, em %, de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida (Glic. Ác.) em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Ceruloplasmina	32,82	71,82	102,8	68,09	111,7	106,0	85,46
Haptoglobina	627,8	1.564	2.047	1.912	2.337	2.336	2.516
Glic. Ác.	3,61	6,55	16,02	0,00	13,82	5,77	2,31

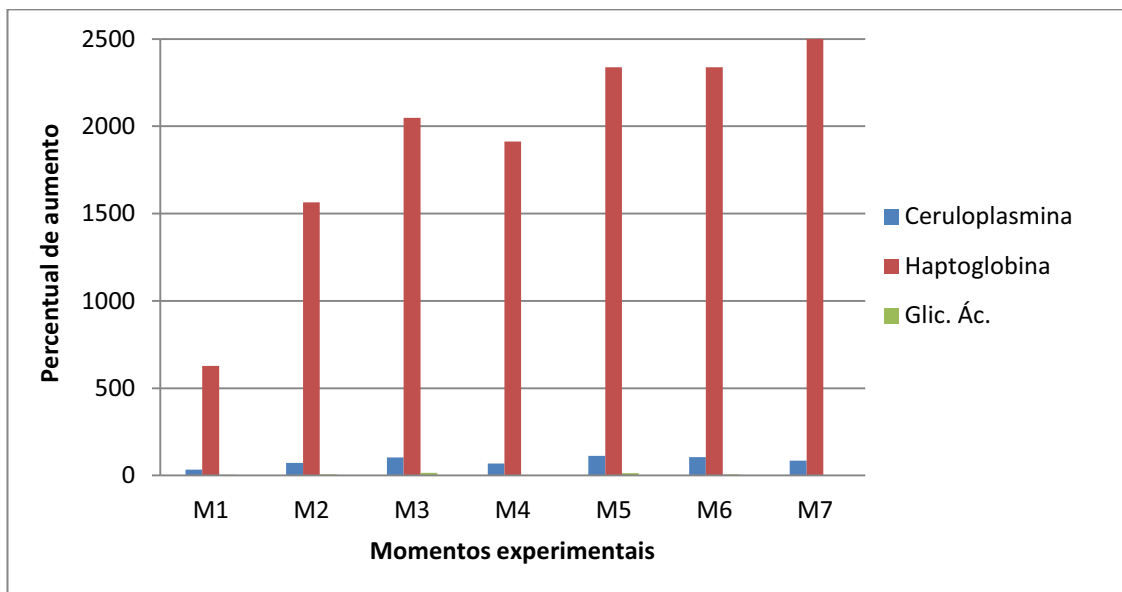


Figura 17. Percentual de elevação das concentrações séricas de ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida em cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, às 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

Tabela 10. Concentrações séricas de ceruloplasmina (CER), haptoglobina (HAP) e α_1 -glicoproteína ácida (G.ÁC.) de cabras inoculadas com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*, grupo GII, no dia da inoculação (M0) e 24h (M1), 48h (M2), 72h (M3), 96h (M4), 120h (M5), 144h (M6) e 168h (M7) após a inoculação.

	M0		M1		M2		M3		M4		M5		M6		M7	
	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)	Média	(LI - LS)
CER	199	232,7	293	342	342	265	301	327	289							
(mg/dL)	(18,5 - 72,5)	(25,6 - 64,6)	(33,7 - 83,5)	(39,2 - 82,6)	(36,8 - 83)	(47,3 - 81,5)	(45,9 - 85,9)	(47,5 - 67)								
HAP	32,4	199	507	702	657	825	833	873								
(mg/dL)	(5,00 - 9,07)	(26,1 - 54,2)	(79,1 - 110)	(44,9 - 190)	(21,6 - 215)	(9,70 - 308)	(4,20 - 281)	(5,70 - 326)								
G.ÁC	75,6	72,2	66,6	74,5	57,5	71,8	58,8	58,3								
(mg/dL)	(10,0 - 19,6)	(11,6 - 17,6)	(9,3 - 16,8)	(10,2 - 26,2)	(8,6 - 14,8)	(11,0 - 17,8)	(9,61 - 15,6)	(7,66 - 16,4)								

LI: Limite inferior

LS: Limite superior

5. CONCLUSÃO

- Haptoglobina foi um biomarcador precoce e confiável na detecção e monitoramento da mastite experimental em cabras, seja ela induzida por *Staphylococcus aureus* ou por *Streptococcus agalactiae*;
- Ceruloplasmina foi um marcador confiável no monitoramento da mastite experimental em cabras, seja ela induzida por *Staphylococcus aureus* ou por *Streptococcus agalactiae*;
- Fibrinogênio plasmático foi um bom indicador no monitoramento de mastite caprina induzida por *Staphylococcus aureus* ou por *Streptococcus agalactiae*;
- α_1 -glicoproteína ácida não apresentou importância no diagnóstico da mastite caprina induzida por *Staphylococcus aureus* ou por *Streptococcus agalactiae*, sendo melhor indicador de cronicidade do que da reação inflamatória aguda na mastite induzida por *S. aureus*;
- O leucograma e perfil bioquímico sérico, com exceção das PFA, não se mostraram exames laboratoriais confiáveis como auxílio ao diagnóstico da mastite experimental em cabras, seja ela induzida por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus agalactiae*;
- O modelo de infecção experimental utilizado para indução de mastite clínica em cabras foi efetivo, tanto com o inóculo de $9,5 \times 10^9$ UFC de *Staphylococcus aureus* quanto com $4,4 \times 10^{11}$ UFC de *Streptococcus agalactiae*.

6. REFERÊNCIAS

AIRES DE SOUSA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; MOTTA, O. V.; BONNA, I. C. F.; SILVA, D. A.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples from Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 12, p. 3845-3849, 2007. Abril. 2007. Disponível em: <doi:10.1128/AEM.00019-07>.

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011.

AJUWAPE, A. T. P.; ROBERTS, A. A.; SOLARIN, O. O.; ADETOSOYE, A. I. Bacteriological and haematological studies of clinical mastitis in goats in Ibadan, OYO State, Nigeria. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 60, p. 307-310, 2005.

ALSEMGEEEST, S. P. M.; LAMBOOY, I. E.; WIERENGA, H. K.; DIELEMAN, S. J.; MEERKERK, B.; Van EDEREN, A. M.; NIEWOLD, T. A. Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (HP) in calves. **Veterinary Quarterly**, Boston, v. 17, n. 1, p. 9-12, 1995.

ALVES, F. S. F.; CHAPAVAL, L.; PINHEIRO, R. R. **Enfermidades e microrganismos passíveis de transmissão pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos**. Sobral: EMBRAPA Caprinos, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/doc59.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2010.

ANOSA, V. O.; OGBOGU, D. A. The effect of parturition on the blood picture of sheep. **Research in Veterinary Science**, London, v. 26, n. 3, p. 380-382, 1979.

BAZAN, R.; CERVANTES, E.; SALAS, G.; SEGURA-CORREA J. C. Prevalencia de mastitis subclínica en cabras lecheras en Michoacán, México. **Revista Científica**, Maracaibo, v. 19, n. 4, p. 334-338, 2009.

BASTOS, B. L.; MEYER, R.; GUIMARÃES, J. E.; AYRES, M. C.; GUEDES, M. T.; MOURA-COSTA, L. F.; BURGHGRAVE, U. S.; SENA, L.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Clinical Pathology**, Hoboken, v. 40, n. 4, p. 496-503, 2011.

BENDIXEN, E.; DANIELSEN, M.; HHOLLUNG, K.; GIANAZZA, E.; MILLER, I. Farm animals proteomics: a review. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 282-293, 2011.

BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis in dairy small ruminants. **Veterinary Research**, London, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.

BHATTACHARYA, A. Etiology and antibiotic spectra of bacterial isolates from the field cases of mastitis in cows from west Tripura District. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 80, n. 6, p. 499-501, 2002.

BRAUN, J. P.; TRUMEL, C.; BÉZILLE, P. Clinical biochemistry in sheep: A selected review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 92, p. 10-18, 2010.

CARTER, G. R.; WISE, D. J. **Essentials of veterinary bacteriology and micology**. 6. ed. Iowa: Iowa State Press, 2004. p. 183-188, 193-197.

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.

CHIARADIA, E.; AVELLINI, L.; TARTAGLIA, M.; GAITI, A.; JUST, I.; SCOPPETTA, F.; CZENTNAR, Z.; PICH, A. Proteomic evaluation of sheep serum proteins. **BMC Veterinary Research**, London, v. 8, n. 66, p. 13, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-8-66>>.

COLE, D. J.; ROUSSEL A. J.; WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute-phase proteins. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 92, p. 470-470, 1997.

COLLA, M. F.; VALLE, S. F.; SECCHI, P.; DUDA, N.; SCALON, M.; DÜRR, J. W.; GONZÁLEZ, F. Valores de haptoglobina plasmática em vacas com diferentes contagens de células somáticas em amostras de leite. **Ciência Animal Brasileira**, Belo Horizonte, v. 10, suppl. 1, p. 739-743, 2009.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; AITCHISON, T. C.; DOUGLAS, T. A. Bovine acute phase response following turpentine injection. **Research in Veterinary Science**, London, v. 44, p.82–88, 1988.

CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 339-356, 2011.

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

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHÉZ, A.; CORRALES, J. C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 79, p. 273-283, 2003.

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

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

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

DANSCHER, A. M.; THOEFNER, M. B.; HEEGAARD, P. M. H.; EKSTRØM, C. T.; JACOBSEN, S. Acute phase protein response during acute ruminal acidosis in cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 135, p. 62-69, 2011.

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

DIARRA, M. S.; PETITCLERC, D.; LACASSE, P. Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to iron sources. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2141-2148, 2002.

DJEBABRI, B. **The role of haptoglobina in phagocyte-mediated killing of *Staphylococcus aureus***. 2010. 218 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Faculty of Medicine and Biological Sciences, University of Leicester. Spring Term, 2010.

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

ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins as biomarkers of disease in production animals. In: THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY PATHOLOGISTS, 57.; AMERICAN SOCIETY FOR VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY, 41., 2006, Tucson. **Proceedings...** Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/acvp/2006/Eckersall2.pdf?LA=>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

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

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; McCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S.; WEBER, A.; McDONALD, T.; NOLAN, A. M.; FITZPATRIK, J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 148, n. 2, p. 35-41, 2001.

ECKERSALL, P. D.; LAWSON, F. P.; BENICE, L.; WATERSTON, M. M.; LANG, T. L.; DONACHIE, W.; FONTAINE, M. C. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. **Biomed Central Veterinary Research**, London, v. 3, n. 1, p. 35, 2007.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C. Serum concentrations of copper, iron and zinc during *E. coli* induced-mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 508-413, 1993.

FAGLIARI, J. J. Estudo clínico e laboratorial da pneumonia de bezerros induzida pela inoculação intrabronquial de *Mannheimia haemolytica*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 8-14, 2003.

FAGLIARI, J. J.; PASSIPIERI, M.; OKUDA, H. T.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1355-1358, 2007.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO [2007] FAOSTAT – FAO Statistics Division/Prod STAT: livestock (primary and processed). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/596/DesktopDefault.aspx?PageID=569>>. Acesso em 15 Ago 2010.

GOMES, M. J. P. Gênero *Streptococcus agalactiae* In: LABACVET 2008-2. 2008. **Microbiologia clínica**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/streptococcus_2008-2.pdf>. Acesso em 17 ago. 2012.

GONZÁLEZ, F. H. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobina em rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. **Anales de Veterinaria Murcia**, Murcia, v. 23, p. 5-17, 2007.

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

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

HEEGAARD, P. M. H.; GODSON, D. L.; TOUSSAINT, M. J. M.; TJØRNEHØJ, K.; LARSEN, L. E.; VIUFF, B.; RØNSHOLT, L. The acute phase response of haptoglobina and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 77, p. 151-159, 2000.

IBTISAM EL-ZUBEIR, E.M.; EL OWNI, O.A.O.; MOHAMED, G.E Correlation of minerals and enzymes in blood serum and milk of healthy and mastitic cows. **Research Journal of Agriculture and Biological Science**, Jordan, v. 1, n. 1, p. 45-49, 2005.

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

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

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of Pharmacology and Bioallied Science**, Maharashtra, v. 3, n. 1, p. 118-127, 2011.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Maryland Heights, v. 23, n. 3, p. 377-402, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. New York: Academic Press, 2008. p. 123-144, 331-344, 354-370, 882-888.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for, Microbiology, 1991. 1364 p.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; DWIVEDI, S. K.; GUPTA, M. K. Prevalence and antibiotic profile of bacterial isolates from bovine mastitis in Mathura. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 38, n. 1, p. 31-34, 2010.

KUMAR, A.; VERMA, A. K.; RAHAL, A.; SHARMA, A. K.; VARSHNEY, S.; GUPTA, M. K. Short Communication: Outbreak of mastitis in sheep flock due to *Streptococcus agalactiae* and unusual neonatal lamb mortality. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Lahore, v. 1, n. 4, p. 120-122, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LASAGNO, M. C.; VISSIO, C.; REINOSO, E. B.; RASPANTI, C.; YACIUK, C.; LARRIESTRA, A. J.; ODIERNO, L. M. Development of an experimentally induced *Streptococcus uberis* subclinical mastitis in goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 376-383, 2012.

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

LI, H.; YU, J.; LI, X.; LUO, J.; XU, J.; GUO, F.; ZHANG, L. Inducing acute mastitis in milk goats by using three common pathogenic bacteria isolated from dairy mastitis. **Progress in Veterinary Medicine**, San Diego, v. 4, 2004.

MA, J. L.; WANG, J. F.; WANG, K.; WU, C. X.; LAI, T.; ZHU, Y. H. Short communication: changes in micro mineral, magnesium, cytokine, and cortisol concentrations in blood of dairy goats following intramammary inoculation of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 4679-4683, 2007.

MacFADIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Willians & Willians, 1976. 312 p.

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

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 74-83, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.08.013>>.

MORK, T.; KVITILE, B.; MATHISEN, T.; JORGENSEN, H. J. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p. 134-141, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.019>>.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal, London**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

NAGAHATA, H.; TAGUCHI, K.; NODA, H. Preliminary studies on the acid soluble glycoproteins in serum and their diagnostic value for acute inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v. 13, p. 257–263, 1989.

NATHAWAT, P.; BHATI, T.; SHARMA, S. K.; MOHAMMED, N.; KATARIA, A. K. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in lactating goats with clinical mastitis and their antibiogram studies. **Animal Biology and Animal Husbandry Bioflux**, Cluj-Napoca, v. 5, n. 1, p. 32-37, 2013.

NIELSEN, B. H.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H.; NIEWOLD, T. A.; HEEGAARD, P. M. H. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. **Veterinary Record**, London, v. 154, n. 12, p. 361-365, 2004.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 63, n. 6, p. 675-678, 2001.

O'MAHONY, M. C. O.; HEALY, A. M.; HARTE, D.; WALSHE, K. G.; TORGERSON, P. R.; DOHERTY, M. L. Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. **Research in Veterinary Science**, London, v. 80, n. 2, p. 155–161, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.005>>.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>>.

PATELLI, T. H. C.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, São Paulo, v. 45, supl., p. 481-187, 2008.

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

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, London, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PFEFFER A.; ROGERS K. M.; O'KEEFFE L.; OSBORN P. J. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. **Research in Veterinary Science**, London, v. 55, n. 3, p.360-366, 1993.

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

PISONI, G.; MORONI, P.; GENINI, S.; STELLA, A.; BOETTCHER, P. J.; CREMONESI, P.; SCACCABAROZZI, L.; GIUFFRA, E.; CASTIGLIONI, B. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 135, n. 3-4, p. 208-217, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.016>>.

POLIZOPOULOU, Z. S. Haematological testes in sheep health management. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 92, p. 88-91, 2010.

POSTLE, D. S.; ROGUINSKY, M.; POUTREL, B. Induced staphylococcal infection in the bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 39, n. 1, p. 29-35, 1978.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Editora Roca, 2005. 513 p.

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

RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 6, p. 825-829, 2005.

REGASSA, F.; SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E. Effect of experimentally induced metritis on uterine involution, acute phase protein response and PGFM secretion in the postpartum ewe. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 19, p. 605-607, 2002.

SALONEN, M.; HIRVONEN, J.; PYORALA, S.; SANKARI, S.; SANDHOLM, M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 60, n. 1, p. 88-91, 1996.

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

SAUT, J. P. E.; BIRGEL JUNIOR, E. D. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 588-597, 2006.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 110-124, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033>>.

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

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

SINGH, V.; RAM, M.; ROY, B. K.; SINGH, K. K. Effect of induced mastitis on disposition kinetics of gatifloxacin following intravenous administration in goats. **Journal of Bioanalysis and Biomedicine**, Los Angeles, v. 2, n. 2, p. 44-47, 2010.

SKINNER, J. G.; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep **Veterinary Record**, London, v. 134, n. 2, p. 33-36, 1994.

SPOONER, R. L.; MILLER, J. K. The measurement of haemoglobin reactive protein in ruminants as an aid to the diagnosis of acute inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 88, n. 1, p. 2-4, 1971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/vr.88.1.2>>.

STUHR, T.; AULRICH, K.; BARTH, K.; KNAPPSTEIN, K.; LARSEN, T. Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 111, n. 1-3, p. 139-146, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.004>>.

SUOJALA, L.; ORRO, T.; JÄRVINEN, H.; SAATSI, J.; PYÖRÄLÄ, S. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Denmark, v. 50, p. 18-28, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-50-18>>.

TARIQ, A.; SHAHZAD, A.; KUASAR, R.; MEHFOOZ, A.; MANZOOR, A.; IJAZ, M.; RASHID, I.; MAHMOOD, N.; TAHIR, J.; ZAIDI, S. H. T.; FIAZ, U. A.; QURESHI, M. S. Case report: gangrenous mastitis an important *Staphylococcus aureus* related problem in goat husbandry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Lahore, v. 2, n. 1, p. 46-49, 2014.

TAYLOR, J. A. Leucocyte responses in ruminants. *In*. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 391-404.

THULASIRAMAN, P. J. M.; BANERJEE, D.; PANDIYAN, G. D. V.; DAS, K.; GHOSH, P. R.; DAS, P. K. Acute phase proteins – a potent biomarker for mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vanloese, v. 7, n. 2, p. 6-14, 2013.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

ULUTAS, P. A.; OZPINAR, A. Effect of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* infection on acute phase proteins and some mineral levels in colostrums-breast milk-fed or colostrums-breast milk-deprived sheep. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v. 30, p. 485-495, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11259-006-3246-z>>.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Masby Year Book, 1991. 557 p.

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

WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 42, n. 1, p. 45-66, 1978.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p. 307-313.

ZOCCAL, R. **Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais, 1996-2006**. Embrapa Gado de Leite, out. 2007. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

Apêndice I. Parâmetros de avaliação utilizados no exame diário da secreção láctea de cabras do Grupo GI inoculadas com *Staphylococcus aureus*.

Parâmetros	Animal	Teto	Avaliação									
			M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7		
COR DA SECREÇÃO												
1 - Branca (sem alteração)	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
2 - Amarelada	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
3 - Avermelhada (sanguinolenta)	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1
		TD	1	1	2	2	3*	3*	3*	3*	3*	3*
ASPECTO DA SECREÇÃO												
	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	3	3	3	3	3	3	3	3	1
	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	4	3	3	3	3	3	3	1
1 - Característico	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
2 - Aguado	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 - Denso	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4 - Viscoso	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	2	5	5	5	5	5	5	5
5 - Perda das características de secreção láctea	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	4	4	1	1	1	1	1	1	1
PROVA DA CANECA DE FUNDO ESCURO												
	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	3	6	6	6	6	6	6	4	1
1 - Negativa (sem alteração)	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
2 - Grumos pequenos nos 1 ^{os} jatos	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 - Poucos grumos pequenos	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4 - Vários grumos pequenos	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	6	6	6	6	6	6	5	***
5 - Poucos grumos grandes	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	4	4	4	4	4	4	4	2	2
6 - Vários grumos grandes	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Cap.3	TE	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
		TD	1	4	4	4	4	4	4	4	4	3
	Cap.4	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		TD	2	4	3	3	3	3	3	4	4	4
	Cap.5	TE	1	1	1	1	2	2	2	4	4	2
		TD	1	3	4	5	5	5	5	5	5	5

*Perda das características de secreção láctea (secreção sero-sanguinolenta). **Teto cessou produção, impossível a colheita de amostras. ***Teto desvitalizado e duro, impossibilitando ordenha.

Apêndice II. Parâmetros de avaliação utilizados no exame diário da secreção láctea de cabras do Grupo GII, inoculadas com *Streptococcus agalactiae*

PARÂMETROS	Animal	Teto	Avaliação										
			M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7			
COR DA SECREÇÃO 1 - Branca (sem alteração) 2 - Amarelada 3 - Avermelhada (sanguinolenta)	Cap. 1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Cap. 1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3
	Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	TD	1	2	3	3	3	1	1	1	1	1	1	
Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	3	4	3	3	3	3	3	3	3	1	
Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	3	4	4	4	3	3	3	4	4	3	
Cap. 1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	4\5	4	4	4	4	4	4	6	6	4	
Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	1	4	3	3	3	3	3	3	3	2	
Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	4	3	3	3	4	4	3	4	3	1	
Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Cap. 1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	
Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	
Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	2	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	
Cap.4'	TE	1	1	3	3	3	2	2	2	2	2	1	
	TD	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Cap. 1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	

ASPECTO DA SECREÇÃO	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
1 - Característico	1	1	1	1	1	1	1	1
2 - Aguado	1	1	1	1	1	1	1	1
3 - Denso	1	1	1	1	1	1	1	1
4 - Viscoso	1	1	1	1	1	1	1	1
5 - Perda das características de secreção láctea	1	1	1	1	1	1	1	1

PROVA DA CANECA DE FUNDO ESCURO	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
1 - Negativa (sem alteração)	1	1	1	1	1	1	1	1
2 - Grumos pequenos nos 1 ^{os} jatos	1	1	1	1	1	1	1	1
3 - Poucos grumos pequenos	1	1	1	1	1	1	1	1
4 - Vários grumos pequenos	1	1	1	1	1	1	1	1
5 - Poucos grumos grandes	1	1	1	1	1	1	1	1
6 - Vários grumos grandes	1	1	1	1	1	1	1	1

CMT	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
1 - Negativo	1	1	1	1	1	1	1	1
2 - + - - -	1	1	1	1	1	1	1	1
3 - + + - -	1	1	1	1	1	1	1	1
4 - + + + -	1	1	1	1	1	1	1	1
5 - Reação descaracterizada (sem gelatinização, com forte alteração da coloração)	1	1	1	1	1	1	1	1

*Perda das características de secreção láctea (secreção sero-sanguinolenta). **Teto cessou produção, impossível a colheita de amostras. ***Teto desvitalizado e duro, impossibilitando ordenha.

Apêndice III. Parâmetros de avaliação utilizados no exame diário da glândula mamária de cabras do Grupo GI inoculadas com *Staphylococcus aureus*

PARÂMETROS	Animal	Teto	AVALIAÇÃO							
			M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
TEMPERATURA LOCAL										
1- Normotérmico	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
2- Hipertérmico	Cap.1	TD	1	2	2	1	1	1	1	1
3- Hipotérmico	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.2	TD	1	2	2	2	2	1	1	1
	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.3	TD	1	1	2	2	2	2	1	1
	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.4	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TD	1	1	2	3	3	3	3	3
SENSIBILIDADE DOLOROSA										
	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.1	TD	1	4	2	1	1	1	1	1
	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.2	TD	1	1	4	3	2	2	1	1
1- Ausente	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
2- Leve	Cap.3	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
3- Moderada	Cap.3	TD	1	1	1	1	1	1	2	3
4- Intensa	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
5- Perda da sensibilidade	Cap.4	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TD	1	1	3	5	5	5	5	5
CONSISTÊNCIA DO TECIDO MAMÁRIO										
	Cap.1	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.1	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.2	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.2	TD	1	1	3	3	2	2	1	1
1- Sem alteração	Cap.3	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
2- Firme, porém sem fibrose	Cap.3	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
3- Edemaciada ('Godet' positivo)	Cap.4	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
4- Endurecida e/ou com nodulações	Cap.4	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
5- Tecido duro (desvitalizado)	Cap.4	TD	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TE	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5	TD	1	1	3	4	5	5	5	5

Apêndice IV. Parâmetros de avaliação utilizados no exame diário da glândula mamária do Grupo GII inoculadas com *Streptococcus agalactiae*

PARÂMETROS	Animal	Teto	AVALIAÇÃO								
			M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
TEMPERATURA LOCAL											
1- Normotérmico 2- Hipertérmico 3- Hipotérmico	Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	2	1	1	1	1	1	2
	Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	1	1	1	1	2	2	1
	Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	2	1	1	1	1	2	2
	Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		TD	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	2	3	3	3	3	3	3	3	
Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	1	4	4	4	4	4	4	4	
Cap. 2'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	TD	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Cap. 3'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	TD	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Cap. 4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	1	3	3	3	3	4	4	4	
Cap. 5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	TD	1	1	3	3	3	3	4	4	4	
SENSIBILIDADE DOLOROSA											
1- Ausente 2- Leve 3- Moderada 4- Intensa 5- Perda da sensibilidade	Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	2	2	1	1	1	2	2	
	Cap.2'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	2	1	1	1	1	1	1	
	Cap.3'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Cap.4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Cap.5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	2	3	3	3	3	3	3	
	Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	4	4	4	4	4	4	
	Cap. 2'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	
		TD	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Cap. 3'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	
	TD	2	2	2	2	2	2	2	2		
Cap. 4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1		
	TD	1	1	3	3	3	3	4	4		
Cap. 5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1		
	TD	1	1	3	3	3	3	4	4		
CONSISTÊNCIA DO TECIDO MAMÁRIO											
1- Sem alteração 2- Firme, porém sem fibrose 3- Edemaciada ('Godel' positivo) 4- Endurecida e/ou com nodulações 5- Tecido duro (desvitalizado)	Cap.1'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	4	4	4	4	4	4	
	Cap. 2'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	
		TD	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Cap. 3'	TE	2	2	2	2	2	2	2	2	
		TD	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Cap. 4'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	3	3	3	4	4	4	
	Cap. 5'	TE	1	1	1	1	1	1	1	1	
		TD	1	1	3	3	3	4	4	4	

