

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PROTEINOGRAMA DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA EM
FUNÇÃO DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS E DE MICRORGANISMOS
ISOLADOS E IDENTIFICADOS POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL

Fernanda Antunha de Freitas
Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

GOIÂNIA
2017



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Fernanda Antunha de Freitas

Título do trabalho: Proteinograma de leite de vacas com mastite subclínica em função do escore de células somáticas e de microrganismos isolados e identificados por microbiologia convencional

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Fernanda Antunha de Freitas
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Abelardo José de Magalhães
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 28 / 08 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

FERNANDA ANTUNHA DE FREITAS

**PROTEINOGRAMA DO LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA EM
FUNÇÃO DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS E DE MICRORGANISMOS
ISOLADOS E IDENTIFICADOS POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Ciência Animal da
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Controle e Qualidade de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita – EVZ – UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr.–Antônio Nonato de Oliveira – EVZ – UFG

Prof. Dr.– Edmar Soares Nicolau – EVZ – UFG

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Antunha de Freitas, Fernanda

Proteinograma de leite de vacas com mastite subclínica em função do escore de células somáticas e de microrganismos isolados e identificados por microbiologia convencional [manuscrito] / Fernanda Antunha de Freitas. - 2017.

xvii, 74 f.: il.

Orientador: Prof. Albenones José de Mesquita; co-orientador Edmar Soares Nicolau; co-orientador Antônio Nonato de Oliveira. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Contagem de células somáticas. 2. mastite. 3. microrganismos. 4. proteínas. I. José de Mesquita, Albenones, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **247** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Fernanda Antunha de Freitas**.
4 Às **14h00min** do dia **10/05/2017**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Fernanda**
8 **Antunha de Freitas**, intitulada “**Proteinograma do leite de vacas com mastite subclínica em**
9 **função do escore de células somáticas e de microrganismos isolados e identificados por**
10 **microbiologia convencional**”, apresentada para obtenção do **Título de Doutor em Ciência**
11 **Animal**, junto à Área de Concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos**
12 desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Prof. Dr. Albenones José de Mesquita**,
13 iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Fernanda Antunha de Freitas** para
14 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,
15 pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a argüir o (a) candidato (a),
16 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
17 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
18 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)
19 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

20 Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

APROVADO

21 Prof. Dr. Rodrigo Balduino Soares Neves

Aprovado

22 Dr. Valter Ferreira Felix Bueno

Aprovado

23 Profa. Dra. Marília Cristina Sola

Aprovada

24 Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes

Aprovada

25 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Fernanda**
26 **Antunha de Freitas**, HABILITADA [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)]
27 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33 _____
 34 _____
 35 _____
 36 _____
 37 _____
 38 _____
 39 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:
 40 _____
 41 _____
 42 _____
 43 _____
 44 _____
 45 _____

46 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Albenones José de Mesquita**, lavrei a presente ata que,
 47 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

48 Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Albenones José de Mesquita

49 Prof. Dr. Rodrigo Balduino Soares Neves

Rodrigo Balduino Soares Neves

50 Dr. Valter Ferreira Felix Bueno

Valter F. F. Bueno

51 Profa. Dra. Marília Cristina Sola

Marília Cristina Sola

52 Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes

Iolanda A. Nunes

Aos meus pais, às minhas irmãs, e
ao meu noivo, por todo amor e
carinho. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Maria, mãe de Deus, por sempre guiar meu caminho e me acompanhar.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Albenones José de Mesquita. Foram muitos anos trabalhando juntos e, cada vez mais, a minha admiração pelo senhor aumenta. Obrigada professor, por todos esses anos de trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, atenção e carinho. O senhor é um exemplo de pessoa e profissional;

Obrigada aos meus pais, Marcius Ribeiro de Freitas e Olivia Antunha de Freitas, por todo amor e compreensão que têm por mim. Obrigada pela confiança e apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigada às minhas irmãs, Mônica e Cláudia Antunha de Freitas que, mesmo morando longe, estão sempre presentes. Obrigada ao meu noivo, Ronaldo Figueiredo Alves, por acreditar em mim e me fazer uma pessoa melhor. Amo todos vocês;

Obrigada aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau e Prof. Dr. Antônio Nonato de Oliveira que, desde o início da minha faculdade, em 2007, me apoiam e oferecem oportunidades na área. Sou grata a vocês pelas oportunidades de estágios no Centro de Pesquisa em Alimentos e por todo conhecimento adquirido. Obrigada também aos demais professores do CPA, Prof.a Dr.a Cíntia Silva Minafra e Rezende, Prof. Dr. Cristiano Sales Prado, Prof.a Dr.a Iolanda Aparecida Nunes e Prof. Dr. Moacir Evandro Lage, e a todos os funcionários do CPA;

Obrigada a todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal e da Escola de Veterinária e Zootecnia, pelo todo conhecimento adquirido, tanto profissional, quanto pessoal, nesses últimos dez anos;

Obrigada aos técnicos do Laboratório Multiusuário de biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e, em especial, a Elaine e Alex, por permitirem e acompanharem a execução deste estudo.;

Obrigada à minha querida amiga Alana Maria Menezes Di Calaça. Já são muitos anos de amizade e companheirismo. Obrigada por me apoiar em todos esses anos, por ouvir minhas lamentações e me acolher sempre que preciso. Amo você;

Obrigada aos meus queridos amigos do cafofo, Aline Pedrosa de Oliveira, Janaína Costa Feistel, Julierme José de Oliveira, Marília Cristina Sola e Ursula Nunes Rauecker. Obrigada por alegrarem meus dias e tornar esses anos melhores. Conheci vocês na pós-graduação, mas tenho certeza que vão ser amigos para a vida toda. Amo vocês;

Obrigada à querida Renata Pfrimer, minha nova amiga, que tanto me ajudou no experimento. Desejo-te tudo de bom e espero te ajudar da mesma forma que me ajudou;

A todos os meus colegas da pós-graduação, Angélica, Thais, Francine, Maria Izabel, Renata, Welman, Nayana, Greice, Jaires, muito obrigada;

E por último, mas não em último, agradeço às minhas outras duas “irmãs”, Shayera e Lupita. Vocês duas, que estão sempre comigo, me fazendo companhia no dia-a-dia. Fazem minha vida mais feliz;

Agradeço ainda á CAPES, por fornecer apoio financeiro essencial para que eu pudesse dedicar-me integralmente às atividades de Pós-graduação;

Agradeço a todos que, de um jeito ou de outro, contribuíram para a finalização do Doutorado.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 1 |
| CAPÍTULO 2 – CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS E O PROTEINOGRAMA DO LEITE DE VACAS..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 13 |
| 2. Material e Métodos..... | 16 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 23 |
| 4. Conclusão..... | 38 |
| Referências..... | 35 |
| CAPÍTULO 3 – PROTEINOGRAMA DO LEITE DE VACAS E PRESENÇA DE MICRORGANISMOS..... | 42 |
| 1. Introdução..... | 44 |
| 2. Material e Métodos..... | 46 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 51 |
| 4. Conclusão..... | 64 |
| Referências..... | 65 |
| CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 72 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 02

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | A) <i>Chip</i> utilizado para realização da análise de eletroforese microfluídica (Agilent 2100 Bioanalyzer ®). Capacidade para 10 amostras. (B) Representação gráfica dos poços e canais de um <i>chip</i> para eletroforese microfluidica. Os poços G1-G4 foram preenchidos com <i>Gel-Dye Mix</i> ; DS foi preenchido com <i>Destaining Solution</i> ; S1-S10 preenchidos com amostras; e L preenchido com <i>Ladder</i> . A seta de letra (A) indica os canais de separação, a letra (B) posição de descoloração; e a letra (C) posição da janela de detecção..... | 20 |
| FIGURA 2 | Representação gráfica dos picos de proteínas purificadas (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina, lactoferrina e IgG) e respectivo peso molecular (kDa)..... | 21 |
| FIGURA 3 | Eletroferograma do marcador de peso molecular <i>Ladder</i> | 22 |
| FIGURA 4 | Representação gráfica da concentração total das proteínas expressas nos grupos de ECS..... | 28 |
| FIGURA 5 | Eletroferogramas de amostras de leite de vacas com ECS de 1 a 5..... | 29 |

CAPÍTULO 03

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Etapas/Esquema da análise microbiológica realizada..... | 48 |
| FIGURA 2 | Eletroferograma do marcador de peso molecular <i>Ladder</i> | 49 |
| FIGURA 3 | Representação gráfica dos picos de proteínas purificadas (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina, lactoferrina e IgG) e respectivo pelo molecular (kDa)..... | 50 |
| FIGURA 4 | Representação gráfica da identificação dos microrganismos isolados das amostras de leite de vacas em lactação coletadas..... | 52 |
| FIGURA 5 | Representação esquemática do número de amostras de leite de cada grupo de microrganismos utilizadas para análise de proteinograma..... | 55 |
| FIGURA 6 | Representação gráfica da concentração total das proteínas expressas de acordo com o grupo de microrganismos presentes nas amostras de leite de vacas. Goiânia – GO, 2017..... | 56 |
| FIGURA 7 | Eletroferogramas de amostras de leite de vacas de acordo com os microrganismos isolados..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 02

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1 | Análise descritiva da composição centesimal por escore de célula somática..... | 24 |
| TABELA 2 | Análise descritiva da diferença de concentração das proteínas totais expressas nas amostras em função dos Escores de Célula Somática..... | 28 |
| TABELA 3: | Análise descritiva da variável concentração das proteínas identificadas nas amostras de leite..... | 30 |

CAPÍTULO 03

| | | |
|----------|--|----|
| TABELA 1 | Análise descritiva da diferença de concentração total das proteínas expressas nas amostras por microrganismo identificado..... | 56 |
| TABELA 2 | Análise descritiva da variável concentração das proteínas identificadas nas amostras leite de acordo com o grupo do microrganismo isolado..... | 59 |

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 02

| | | |
|----------|---|----|
| QUADRO 1 | Grupos de divisão das amostras de acordo com a CCS..... | 17 |
| QUADRO 2 | Modo de preparo e condições de armazenamento do <i>Agilent Protein Kit</i> 230..... | 19 |
| QUADRO 3 | Proteínas do soro e peso molecular correspondente..... | 26 |

CAPÍTULO 03

| | | |
|----------|--|----|
| QUADRO 1 | Proteínas do soro e peso molecular correspondente..... | 57 |
|----------|--|----|

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| α-LA | Alfa-lactoalbumina |
| β-LG | Beta-lactoglobulina |
| ALB | Albumina |
| CBT | Contagem Bacteriana Total |
| CCS | Contagem de Células Somáticas |
| céls/mL | Células por mililitro |
| CMT | <i>California Mastitis Test</i> |
| CPA | Centro de Pesquisa em Alimentos |
| Da | Daltons |
| Embrapa | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| ECS | Escore de Células Somáticas |
| EVZ | Escola de Veterinária e Zootecnia |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IgG | Imunoglobulina G |
| In | Instrução Normativa |
| IIM | Inflamação intramamária |
| IPTSP | Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública |
| kDa | Kilodaltons |
| kg | Kilogramas |
| LF | Lactoferrina |
| LPO | Lactoperoxidase |

| | |
|---------------|--|
| LQL | Laboratório da Qualidade do Leite |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| mL | Mililitro |
| PAM | Peptídeo Antimicrobiano |
| SCN | Bactérias coagulase negativa do gênero <i>Staphylococcus</i> |
| UFC/mL | Unidades formadoras de colônias por mililitro |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |

RESUMO

As infecções intramamárias podem ser causadas por um grande número de agentes etiológicos e cursar com alterações no parênquima da glândula mamária, na composição no leite e no volume de leite produzido. Considerando o exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o perfil eletroforético de proteínas de amostras de leite de vacas por meio da análise de eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* e suas alterações em relação às amostras de leite com diferentes CCS e à presença de microrganismos patogênicos. Foram coletadas 101 amostras de leite de vacas provenientes de duas propriedades leiteiras localizadas no estado de Goiás. Foram realizadas análises microbiológicas, contagem de células somáticas, composição centesimal e eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*. Para o teste de correlação entre o perfil de proteínas e a CCS as amostras foram estratificadas em cinco grupos de Escores de Células Somáticas. Os dados foram analisados utilizando estatística descritiva por meio do teste de análise de variância e representações gráficas. Verificou-se um aumento significativo no valor do componente proteína em relação aos ECS 1 e 3, 1 e 4 e 1 e 5. Também foi possível observar diferença estatística nos resultados do componente Lactose quando se comparou os ECS 1 e 3 e 3 e 4. Na avaliação descritiva da variável “Concentração” das proteínas do leite foi possível observar diferenças nos valores das concentrações em função do ECS. Observou-se também diferença estatística para os resultados obtidos para as proteínas α -LA, quando comparados os ECS 1,2 e 3 e o ECS 5; para a IgG, as amostras de ECS 4 e 5 apresentaram concentrações diferentes das amostras dos ECS 1,2 e 3; e a proteína LF, apresentou resultados diferentes entre as amostras de ECS 1 e 5. Os microrganismos isolados e identificados que apresentaram crescimento nas amostras coletadas foram bactérias coagula negativo do gênero *Staphylococcus*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. e leveduras. Não há evidência estatística de que a média da concentração das proteínas presentes nas amostras de leite de vacas seja diferente entre nenhum grupo de amostras com diferentes microrganismos avaliados. Na comparação entre as concentrações de cada proteína expressa em cada grupo de amostras, verificou-se diferença estatística na concentração da proteína α -lactalbumina entre as amostras do grupo de leveduras e amostras sem crescimento bacteriano. Concluiu-se que proteínas de alta abundância do soro de leite tem sua concentração diminuída em função da severidade da mastite; proteínas de defesa, como Lactoferrina, Lactoperoxidase e IgG e IgM têm aumento em suas concentrações quando se comparam amostras de leite de vacas com mastite subclínica e amostras de leite de vacas sadias; as proteínas Lactoferrina e IgG constituem alvos em potencial para identificar vacas com mastite subclínica a partir de amostras de leite, podendo ser consideradas biomarcadores. Concluiu-se ainda que infecções intramamárias causadas pelos microrganismos isolados e identificados no presente estudo não alteram a concentração das proteínas no soro de leite de vacas em lactação; as amostras de leite com altas CCS podem apresentar resultado negativo para cultura microbiológica; os SCN apresentaram maior frequência de isolamento em amostras de leite de vacas em lactação, revelando características de oportunistas e saprófitas; e a infecção da glândula mamária causada por leveduras provoca aumento significativo da proteína α -lactoalbumina.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas, mastite, microrganismos, proteínas.

ABSTRACT

Intramammary infections can be triggered by a large number of etiologic agents and may lead to changes in the mammary gland parenchyma, composition of milk and reduction of milk production. The aim of the present study was to evaluate the electrophoretic profile of cow milk proteins by the analysis of microfluidic electrophoresis lab-on-a-chip and its alterations in relation to milk samples with different SCC and the presence of pathogenic microorganisms. A total of 101 milk samples were collected from cows from two dairy farms located in the state of Goiás. Microbiological analyzes, somatic cell counts, centesimal composition and microfluidic electrophoresis were performed. For the correlation test between the protein profile and the SCC the samples were stratified into five groups of somatic cells scores. The data were analyzed using descriptive statistics through the analysis of variance and graphical representations. There was a significant increase in the value of the protein component in relation to the SCS 1 and 3, 1 and 4 and 1 and 5. It was also possible to observe statistical difference in the results of the Lactose component when comparing SCS 1 and 3 and SCS 3 and 4. The evaluation of the variable "Concentration" of milk proteins was possible to observe differences in the concentration values of SCS. Statistical difference was also observed for concentration of α -LA when compared SCS 1,2 and 3 to SCS 5; For IgG, SCS samples 4 and 5 showed different concentrations of SCS samples 1,2 and 3; the LF protein showed different results among samples from the SCS 1 and 5. The microorganisms identified were *Staphylococcus* spp. Negative Coagulase, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. and yeast. There is no statistical evidence that the mean concentration of the proteins present in milk samples is different between any groups of samples with different microorganisms evaluated. In the comparison between the concentrations of each protein expressed in each group of samples, a statistical difference was observed in the concentration of α -lactalbumin between samples from the yeast group and samples without bacterial growth. It was concluded that whey proteins of high abundance have their concentration decreased with the occurrence of mastitis; Defense proteins such as Lactoferrin, Lactoperoxidase, IgG and IgM have their concentration increased when comparing milk samples from cows with subclinical mastitis and milk samples from healthy cows; Lactoferrin and IgG proteins are potential targets for identifying cows with subclinical mastitis in milk samples and may be considered biomarkers. It was also concluded that intramammary infections caused by the microorganisms identified in the present study do not alter the concentration of whey proteins of lactating cows; Milk samples with high SCC may present negative results for microbiological culture; The SCN showed higher frequency of isolation in milk samples from lactating cows, revealing opportunistic and saprophytic characteristics; And infection of the mammary gland caused by yeast causes a significant increase of the α -lactalbumin protein.

Key-words: Mastitis, microorganisms, proteins, somatic cell count

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil é apontado como o quinto maior produtor de leite no mundo¹, com uma produção de mais de 32,2 milhões de toneladas, representando 4,5% da produção mundial², e produtividade média de 1,60 toneladas de leite/vaca³. Em 2016 o Estado de Goiás, apresentou a sexta maior produção de leite no país, com um total de 2.313.471 mil litros produzidos, ficando atrás de Minas Gerais (9.144.957 mil litros), Rio Grande do Sul (3.249.626 mil litros), Paraná (2.744.029 mil litros), São Paulo (2.558.580 mil litros) e Santa Catarina (2.438.159 mil litros), respondendo por 9,98% da produção do país e 77,47% da produção da Região Centro-Oeste⁴.

De acordo com as projeções do agronegócio brasileiro realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre os anos de 2015/2016 e 2025/2026, o leite é considerado um dos produtos agropecuários com maiores possibilidades de crescimento, com uma taxa anual entre 2,3 e 3,19%, correspondendo a uma produção de, aproximadamente, 415 bilhões de litros de leite cru ao final do período das projeções. Segundo o documento, o consumo de leite também deverá crescer a uma taxa anual semelhante à da produção de leite do país (2,2%). Nos últimos 20 anos, o aumento da oferta na produção de leite foi em torno de 4%, sendo que o desenvolvimento no setor se deu em função da incorporação de tecnologias já existentes, com reflexo positivo na produtividade da cadeia leiteira⁵.

Levando em conta a importância da matéria-prima leite tanto para a economia do Brasil quanto para a indústria leiteira e consumidores, o MAPA promulgou a Instrução Normativa (IN) de nº 51, de 2002, atualizada pela IN 62 de 2011, que estabelecem parâmetros para avaliação da qualidade do leite cru, como a análise de Contagem Bacteriana Total (CBT), análise de Contagem de Células Somáticas (CCS), determinação da composição centesimal e análise de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite^{6,7}. Tais parâmetros foram escolhidos com o intuito de se tornarem ferramentas indispensáveis na produção, beneficiamento e industrialização, uma vez que fornecem informações relacionadas à qualidade do leite, englobando a sanidade da glândula mamária, condições higiênicas de obtenção do leite e valor nutricional^{6,7}. Os limites dos parâmetros CCS e CBT, estabelecidos pela IN 62, foram novamente prorrogados por 24 meses em 2016⁸.

A mastite bovina é considerada a doença de maior ocorrência e importância econômica para a atividade leiteira, acarretando prejuízos decorrentes da diminuição da produção láctea e comprometimento na qualidade do leite^{9,10}. Outros prejuízos são o aumento dos custos de produção com uso de medicamentos e assistência técnica veterinária, a

perda da capacidade de secreção láctea dos quartos mamários com mastite, o descarte de animais com mastite crônica e o descarte de leite de vacas em tratamento. Tudo isso leva à diminuição da qualidade do leite cru e redução da remuneração do produtor por litro de leite produzido, devido a políticas de pagamento por qualidade de indústrias de laticínios⁹⁻¹¹. Em adição ao impacto negativo na eficiência e qualidade da produção, a mastite também é um assunto importante na sanidade da vaca, bem-estar animal e na segurança dos produtos lácteos fornecidos aos consumidores¹²⁻¹⁶.

A mastite ocorre quando um agente infeccioso, químico ou mecânico, invade a glândula mamária via orifício do canal do teto, causando uma reação inflamatória e danos ao tecido glandular que resulta em alterações físicas e químicas indesejadas no leite produzido^{11, 17-19}. As infecções intramamárias são relatadas como as principais causas de mastites clínicas e subclínicas, apesar da mastite ser uma doença multifatorial^{17,19}.

Os principais agentes patogênicos relacionados às mastites são *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*¹². Atualmente, as bactérias coagulase negativas do gênero *Staphylococcus* spp. (SCN) têm se tornado um dos agentes patogênicos causadores de mastites mais frequentemente relatados na literatura²⁰.

A mastite é classificada como clínica e subclínica, podendo ser diferenciada pela forma de apresentação da enfermidade²¹. Na primeira, há a presença de sinais sistêmicos de infecção e sinais clínicos locais, além de alterações na composição e aparência do leite secretado^{16,17}. Na forma subclínica, não se observam as alterações macroscópicas, mas sim alterações na composição do leite, como o aumento de Contagem de Células Somáticas (CCS) e redução na quantidade de leite produzido. Além disso, vacas com mastite subclínica são consideradas focos de contaminação, visto que podem difundir os microrganismos no ambiente e para outros animais^{17,19,22-24}.

O diagnóstico da mastite pode ser realizado por análises durante a ordenha e por análises laboratoriais. As análises de identificação dos animais e quartos mamários enfermos realizadas ao lado do animal durante o momento da ordenha são o *California Mastitis Test* (CMT), realizado para detecção de vacas com mastite subclínica e o teste da caneca de fundo preto, realizado imediatamente antes da ordenha e que permite a observação das características do leite secretado e assim, a detecção de mastites clínicas^{26,27}. As análises laboratoriais englobam as análises microbiológicas para detecção do patógeno causador da enfermidade e de CCS, entre outras, para detecção de mastite subclínica²¹.

O cultivo bacteriano é o método de referência para detecção do agente etiológico da mastite. No entanto, possui algumas limitações, como a demora no isolamento e identificação do microrganismo e a ocorrência de casos em que não há o isolamento bacteriano, devido à baixa concentração do patógeno na amostra ou pela presença de substâncias endógenas no leite com função de inibir o crescimento bacteriano ²³.

As células somáticas são compostas principalmente por células efetoras do sistema imune (linfócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares) e por células de descamação do epitélio alveolar da glândula mamária ^{21,28}. Sua quantidade no leite é reflexo das infecções intramamárias, sendo que em quartos mamários infectados as células somáticas são compostas por 99% de células do sistema imune e, em quartos mamários saudáveis, a porcentagem de células do sistema imunológico é de 80% ²⁸.

A análise de CCS em amostras de leite cru de vacas tem sido utilizada como padrão ouro para o diagnóstico de mastite subclínica, sendo que uma vaca é considerada enferma quando o resultado da análise de CCS é superior de 200.000 cel/mL ²¹. No entanto, a CCS nem sempre está correlacionada com infecções do úbere, visto que também pode ser afetada por fatores relacionados ao animal, como estágio de lactação, raça, estresse, entre outros ^{29,30}.

O CMT também é utilizado como um indicador de mastite subclínica a partir da estimativa da CCS do leite. O resultado é em função da reação do DNA destas células com os reagentes do teste, a partir da formação de solução geleificada ^{26,27}. A reação pode ser classificada em uma escala de zero a cinco: negativo, traços, +, ++, +++ ^{27,31}. No entanto a interpretação pode ser difícil e o teste possui baixa sensibilidade ³².

Sendo assim, o monitoramento da mastite depende da avaliação da aparência do úbere sadio e do leite secretado no momento da ordenha, das análises periódicas de CCS em amostras de leite e, em algumas situações, também pode ser realizado pela mensuração da condutividade elétrica do leite e da concentração de lactose ²⁵. Programas de monitoramento de mastites incluem diferentes estratégias para a prevenção e controle da enfermidade, são elas: a terapia da vaca seca, tecnologias e procedimentos de ordenha, desinfecção do teto com substâncias antissépticas (*pré-dipping* e *pós-dipping*) e antibióticoterapia para animais com mastite clínica. Essas práticas, no entanto, não são completamente eficientes ¹⁹. O tratamento de animais com mastite é necessário, tanto para a sanidade e bem-estar animal quanto para a melhora da qualidade do leite cru e redução da contaminação do rebanho. Entretanto, a utilização de diferentes protocolos de antibióticoterapia ainda é discutida, uma vez que não se tem o consenso sobre o tratamento mais eficiente, seguro e econômico ³³.

Uma questão importante no tratamento da mastite é a forma de administração do antibiótico, seja ela intramamária ou sistêmica. A administração intramamária é a forma mais comumente realizada em rebanhos leiteiros. As vantagens são muitas, entre elas, altas concentrações das substâncias antimicrobianas no leite e baixo consumo do antibiótico, sendo que a droga é colocada apenas no quarto infectado. A desvantagem é a distribuição desigual do antibiótico no úbere. O tratamento intramamário tem maior eficiência em mastites causadas por *Streptococcus* spp., bactérias coagulase negativas do gênero *Staphylococcus* spp. (SCN) e *Corynebacterium* spp. A via de administração sistêmica é conhecida por ser mais eficiente no tratamento de mastites clínicas, uma vez que ocorre a melhor penetração do antibiótico no tecido glandular do úbere por essa via. O tratamento sistêmico tem eficiência em mastites causadas por *S. aureus* ³³.

O uso de antibióticos na rotina é questionável, visto que sua utilização indiscriminada pode gerar resíduos inaceitáveis no leite e ainda gerar isolados de bactérias antibiótico-resistentes ^{19,34}. Uma vez que a mastite bovina é um problema mundial, muitas soluções de tratamento sem antibiótico e novas tecnologias de diagnóstico são estudadas a fim de reduzir a prevalência da enfermidade ¹⁹. Programas de controle e monitoramento de mastites são baseados, principalmente, em práticas de desinfecção do teto, antibioticoterapia e o descarte de vacas com mastite crônica. Entretanto, a procura por alternativas à utilização de antibióticos, como uso de bacteriófagos, vacinas ou compostos naturais, é um campo a ser explorado a fim de se encontrar uma opção eficiente no gerenciamento da mastite bovina ³⁵.

O leite é um fluido corporal complexo que contém uma grande variedade de proteínas secretadas. Elas podem refletir o *status* sanitário da glândula mamária e fornecer informações úteis ao diagnóstico de enfermidade ³⁶. Assim, o estudo de novos indicadores de inflamação presentes no leite torna-se necessário para auxiliar a identificação de animais infectados de maneira mais sensível e específica ^{13,33}.

Um biomarcador é um indicador de processos biológicos normais, patológicos ou de respostas farmacológicas que pode ser identificado, mensurado e avaliado. A identificação de biomarcadores para diagnóstico e monitoramento de mastites em vacas leiteiras reveste-se de grande importância uma vez que podem ser capazes de identificar a doença ainda nos estágios iniciais ³⁸. Devido ao fato da mastite estar associada a um processo inflamatório doloroso e que compromete seriamente a saúde e o bem-estar das vacas infectadas, a identificação de proteínas biomarcadores e sua utilização na rotina da produção leiteira para diagnóstico de mastite pode ter um impacto positivo no bem-estar animal em função da detecção precoce da enfermidade ³⁹.

As proteínas do soro de leite de vacas podem ser divididas em proteínas de maior abundância, que são: α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, e proteínas de pequena abundância provenientes do soro de leite de vacas, a albumina, imunoglobulinas, proteínas do complemento, lactoferrina e lactoperoxidase. As proteínas de baixa abundância são associadas à inflamação, visto que estas possuem funções associadas à defesa do hospedeiro com atividades antimicrobianas.^{40,41}

Na ocasião de um processo inflamatório e infeccioso, ocorre a diminuição da concentração das proteínas de alta abundância sintetizadas na glândula e aumento na concentração das proteínas de origem plasmáticas. Concomitantemente, ocorre também a expressão de outras proteínas relacionadas ao sistema imunológico, como proteínas da família das catelicidinas e calgranulinas S100, β -defensinas, fatores do complemento e proteínas de fase aguda (haptoglobina e soro amiloide a). Devido ao aumento da concentração destas proteínas no leite de vacas com mastites, elas podem ser consideradas biomarcadores em potencial, auxiliando no diagnóstico e prognóstico de infecções intramamárias^{13, 42-45}.

A determinação da composição do perfil de proteínas do soro no leite, e as mudanças que comprometem tais componentes durante o período da lactação é um passo fundamental para melhor compreender a biologia da glândula mamária (Gao et al., 2012). A detecção de proteínas biomarcadores para diagnóstico e monitoramento de mastite e a identificação do agente patogênico causador da infecção constitui uma nova ferramenta para aprimorar o controle e o monitoramento da enfermidade^{34, 41}.

Apesar da importância da mastite bovina para a produção leiteira e para a saúde animal, o tema sanidade da glândula mamária não se reduz apenas ao controle da CCS. Nele também estão incluídas a baixa incidência de mastite clínica e a minimização dos riscos potenciais para a saúde humana, como a prevenção de resíduos de antimicrobianos no leite, da transferência de genes de resistência a antibióticos de patógenos de origem animal para patógenos humanos e, ainda, contaminação por patógenos do leite, provenientes de vacas com mastite, em produtos lácteos. Além das questões de segurança de alimentos, a preocupação com doenças infecciosas nos animais, o bem-estar e a preservação do ecossistema também são pontos a serem considerados no sistema de produção leiteiro²⁸.

Assim, conhecer o perfil de proteínas do soro de leite de vacas com mastite subclínica e suas alterações em função da CCS assume papel de destaque no diagnóstico da enfermidade, visto que a identificação de biomarcadores proteicos tem sido considerada uma ferramenta importante no diagnóstico e auxiliado nos programas de controle de mastites em

propriedades leiteiras, bem como na melhoria da qualidade do leite. Diante do exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o perfil eletroforético de proteínas do soro de amostras de leite de vacas por meio da análise de eletroforese microfluídica “*lab-on-a-chip*” e suas alterações em relação as amostras de leite com diferentes CCS e a presença de bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization of United Nations – FAO, FAO Statistical Year Book – Roma, [online] 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>. Acesso em: 20 fev. 2017.
2. Food And Agriculture Organization of United Nations – FAO, FAO Statistical Year Book, Latin American and Caribbean – Santiago, [online], 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3592e/i3592e.pdf>. Acesso em 16 fev. 2017.
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Indicadores: Leite e Derivados. Ano 8,n.63 – Juiz de Fora [online], 2017. Disponível em: http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2017_02_Indicadores_leite.pdf. Acesso em: 16 fev. 2017.
4. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatísticas da Produção Pecuária. – Brasília: IBGE, 2017. 78p.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2013. 96 p.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002, Brasília: MAPA/SE, 2002.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011, Brasília: MAPA/SE, 2011.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 07 de 03 de maio de 2016, Brasília: MAPA/SE, 2016.
9. Nader Filho, A.; Ferreira, L. M.; Amaral, L. A.; Rossi Junior, O. D.; Oliveira, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arq Instituto Biológico*, 2007; 74 (1): 1-4.
10. Koskinen, M. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 2009; 92: 952-959.
11. Santos, M. V.; Tomazi, T.; Gonçalves, J. L. Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina. *Rev Veterinária e Zootecnia*, 2011; 18 (4): 131-137.
12. Zadoks R, Fitzpatrick J. Changing trends in mastitis. *Ir Vet J*. 2009; 62 (Suppl 4): 59-70
13. Åkerstedt, M.; Forsbäck, L.; Larsen, T.; Svennersten-sjaunja, K. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res*, 2011; 78 (1): 88-96.
14. Alonso-Fauste, I.; Andrés, M.; Iturralde, M.; Lampreave, F.; Gallart, J.; Álava, M.A. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J Proteomics*, 2012; 75 (10): 3015-3030.

15. Keefe, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* , 2012; 28 (2): 203-216.
16. Wellnitz, O.; Bruckmaier, R.M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal*, 2012; 192 (2): 148-152.
17. De Vliegher S, Fox L K, Piepers S, McDougall S, Barkema H W. Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 2012; 95: 1025–40.
18. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard B A. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front. Immunol.* 2014; 5: 1-10
19. Reyes-Jara A , Cordero N, Aguirre J, Troncoso M, Figueroa G. Antibacterial Effect of Copper on Microorganisms Isolated from Bovine Mastitis. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1-10.
20. Taponen S, Nykäsenoja S, Pohjanvirta T, Pitkälä A, Pyörälä S. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet Scand.* 2016; 58: 1-13.
21. Rodha, A.D.; Pantoja, J.C. Using mastitis records and somatic cell count data. *The Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012; 28 (2): 347-361.
22. Halasa T, Nielen M, DeRoos A P, VanHoorne R, deJong G, Lam, T J. Production loss due to one subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.* 2009; 92: 599–606.
23. Koskinen, M. T.; Wellenberg, G. J.; Sampimon, C. O.; Holopainen, L.; Rothkamp, A.; Salmiviki, L.; Van Haeringen, W. A.; Lam, T. J. G. M.; Pyötälä, S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci*, 2010; 93 (12): 5707-5715.
24. Barlow, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2011; 16 (4): 383-407 [acesso em 20 fev 2017].
25. Akers RM, Nickerson SC. Mastitis and its impact on structural and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16: 275-89.
26. Middleton JR, Hardin D, Steevens B, Randle R, Tyler JW. Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with high bulk tank somatic cell. *J An Vet Med Assoc.* 2004; 224 (3): 419-23.
27. Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma AK, Tiwari R, Dhama K, Singh U, Kumar S. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci.* 2013; 16: 1653-61.
28. Schukken Y_H, Wilson D_J, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez R_N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res.* 2003; 34 (5): 579-96.
29. Harmon, R.J. Symposium: Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count—physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 1994; 77 (7): 2103–2112.

30. Schepers, A.J.; Lam, T.J.G.M.; Schukken, Y.H.; Wilmink, J.B.M.; Hanekamp, W.J.A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci*, 1997; 80 (80): 1833–1840.
31. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole, 2007. 314 p.
32. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 2009; 27 (8): 486-93. 29. Rodha AD, Pantoja JC. Using mastitis records and somatic cell count data. *The Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012; 28 (2): 347-361.
33. Pyörala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci- emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009; 134 (1-2): 3-8.
34. Gao X, McMahon RJ, Woo JG, Davidson BS, Morrow AL, Zhang Q. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *J Proteome Res.* 2012; 11 (7): 3897-907.
35. Gomes F, Henriques M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Curr Microbiol.* 2016; 72 (4): 377-82.
36. Bislev SL, Deutsch EW, Sun Z, Farrah T, Aebersold R, Moritz RL, Bendixen E, Codrea MC. A bovine peptide atlas of milk and mammary gland proteomes. *Proteomics.* 2012; 12 (18): 2895-9.
37. Pyörälä, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 2003; 34 (5): 565–578.
38. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L. Farm animal milk proteomics. *J Proteomics*, 2012; 75 (14): 4259-74.
39. Boehmer JL. Proteomic analyses of host and pathogens responses during bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasias.* 2011; 16: 323-38.
40. Smolenski G, Haines S, Kwan FYS, Bond J, Farr V, Davis SR, Stelwagen K, Wheeler TT. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *J Proteome Res*, 2007; 6 (1): 207-15
41. Wheeler, T.T.; Smolenski, G.A.; Harris, D.P.; Gupta, S.K.; Haigh, B.J.; Broadhurst, M.K.; molenaar, A.J.; Stelwagen, K. Host-defense-related proteins in cow’s milk. *Animal Cons*, 2012; 6 (3): 415-422.
42. Eckersall, P.D; Young, F.J; McComb, C; Hogarth, C.J.; Safi, S.; Weber, A.; McDonald, T.; Nolan, A.M.; Fitzpatrick, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec*, 2001; 148 (2): 35–41.
43. Rainard, P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res*, 2003; 34 (5): 647–670.
44. Swanson, K.; Gorodetsky, S.; Good, L.; Davis, S.; Musgrave, D.; Stelwagen, K.; Farr, V.; Molenaar, A. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun*, 2004; 72 (12): 7311–7314.

45. Lutzow, Y.C.; Donaldson, L.; Gray, C.P.; Vuocolo, T.; Pearson, R.D.; Reverter, A.; Byrne, K.A.; Sheehy, P.A.; Windon, R.; Tellam R.L. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. BMC Vet Res, 2008; 2 (4): 1-24.

CAPÍTULO 2 - CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS E O PROTEINOGRAMA DO LEITE DE VACAS

RESUMO

Mastite é definida como a infecção da glândula mamária. Para que o controle das mastites no rebanho seja bem-sucedido é necessário o diagnóstico rápido e com alta acurácia. A análise de CCS em amostras de leite cru de vacas tem sido utilizada como padrão ouro para o diagnóstico de mastite subclínica. Objetivou-se, com o presente estudo, no aspecto geral, investigar a influência do aumento da CCS na expressão das proteínas do soro de leite por meio da utilização da técnica de separação de proteínas de eletroforese microfluídica em microchip (*lab-on-a-chip*). Foram coletadas 104 amostras de leite de vacas em duas propriedades localizadas no Estado de Goiás. As amostras foram analisadas quanto a contagem de células somáticas e eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*. Para o teste de correlação entre o perfil de proteínas e a CCS foram utilizadas 50 amostras de leite e estas foram estratificadas em cinco grupos de escores de células somáticas, sendo utilizado um delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos, avaliado por meio da estatística descritiva e representações gráficas. Verificou-se um aumento significativo no valor do componente proteína em relação aos ECS 1 e 3, 1 e 4 e 1 e 5. Também foi possível observar diferença estatística nos resultados do componente Lactose quando se comparou os ECS 1 e 3 e 3 e 4. Na avaliação descritiva da variável “Concentração” das proteínas do leite foi possível observar diferenças nos valores das concentrações em função do ECS. Foi possível observar diferença estatística para os resultados obtidos para as proteínas α -LA, quando comparados os ECS 1,2 e 3 e o ECS 5; para a IgG, as amostras de ECS 4 e 5 apresentaram concentrações diferentes das amostras dos ECS 1,2 e 3; e a proteína LF, apresentou resultados diferentes entre as amostras de ECS 1 e 5. Concluiu-se que proteínas de alta abundância do soro de leite tem sua concentração diminuída em função da severidade da mastite; proteínas de defesa, como Lactoferrina, Lactoperoxidase e IgG e IgM têm aumento em suas concentrações quando se comparam amostras de leite de vacas com mastite subclínica e amostras de leite de vacas sadias; as proteínas Lactoferrina e IgG constituem alvos em potencial para identificar vacas com mastite subclínica a partir de amostras de leite, podendo ser consideradas biomarcadores.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas, mastite subclínica, proteína

ABSTRACT

Mastitis is the infection of the mammary gland. For the efficient control in herd it is necessary the rapid diagnosis with high accuracy. The analysis of SCC in raw milk samples has been used as a gold standard for the diagnosis of subclinical mastitis. The aim of the present study was to investigate the influence of increased SCC on the expression of milk proteins through the use of analyzes microfluid electrophoresis (lab-on-a-chip). Fifty samples of cow's milk from two properties located in State of Goiás were analyzed. Samples were analyzed for somatic cell counts and lab-on-a-chip microfluidic electrophoresis. For the correlation test between the protein profile and the SCC the samples were stratified into five groups of Scores of Somatic Cell. A completely randomized design with five treatments was used, data were analyzed using descriptive statistics and graphical representations. There was a significant increase in the concentration of the protein component when compared SSC 1 and 3, 1 to 4 and 1 and 5. It was also possible to observe a statistical difference in the results of the Lactose component when comparing SSC 1 and 3 and 3 and 4. In the descriptive evaluation of the variable "Concentration" of the milk proteins it was possible to observe differences in the concentration values as a function of SSC. It was possible to observe statistical difference for the results obtained for α -LA, when compared to ECS 1,2 and 3 and ECS 5; For IgG, samples from SSC 4 and 5 showed different concentrations of samples from SSC 1,2 and 3; and the LF protein, presented different results between the samples of SSC 1 and 5. We concluded that high abundance whey proteins have their concentration decreased with the occurrence of the mastitis; Defense proteins such as Lactoferrin, Lactoperoxidase, IgG and IgM have their concentration increased when comparing milk samples from cows with subclinical mastitis and milk samples from healthy cows; Lactoferrin and IgG proteins are potential targets for identifying cows with subclinical mastitis in milk samples and may be considered biomarkers.

Key-words: Protein, somatic cell count, subclinical mastitis

1. INTRODUÇÃO

Mastite é definida como a inflamação da glândula mamária (inflamação intramamária – IIM) ¹⁻³. A infecção bacteriana da glândula mamária é considerada a principal causa das IIMs e a enfermidade infecciosa de vacas leiteiras de maior importância em todo o mundo ⁴, uma vez que é uma das doenças que mais onera os custos de produção de fazendas leiteiras e indústrias de laticínios. Em adição ao impacto negativo na eficiência e na qualidade da produção, a mastite é um assunto importante na sanidade, bem-estar animal e umas das principais fatores que comprometem a qualidade do leite ⁵⁻⁸.

Para que o controle das IIMs no rebanho seja bem-sucedido é necessário o diagnóstico rápido e com alta acurácia. A detecção das IIMs clínicas pela inspeção visual, palpação e observação das características do leite secretado é relativamente fácil. No entanto, para o controle da enfermidade nos rebanhos, é importante que as mastites subclínicas também sejam identificadas, uma vez que, por não apresentarem sinais clínicos locais ou alteração nas características morfológicas do leite, podem não ser corretamente identificadas e os animais portadores permanecer sem tratamento ⁹⁻¹⁰. Neste caso, contribuem com o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite do tanque e com a diminuição da produção do rebanho ⁹⁻¹¹.

A análise de CCS em amostras de leite cru de vacas tem sido utilizada como padrão ouro para o diagnóstico de mastite subclínica, sendo que um animal é considerado com a enfermidade quando apresenta resultado de CCS acima de 200.000 cel/mL ¹²⁻¹⁶. No entanto, a CCS nem sempre está correlacionada com infecções do úbere, já que também pode ser afetada por alguns fatores relacionados ao animal, como estágio de lactação, raça, estresse, entre outros. ^{5,17,18}.

O leite é um fluido corporal complexo que contém uma grande variedade de proteínas que podem refletir o *status* sanitário da glândula mamária da vaca e fornecer informações úteis para o diagnóstico de enfermidades ^{1,19}. Contém seis proteínas maiores (α 1- caseína, α 2- caseína, β - caseína, κ - caseína, α -lactalbumina (α -LA) e β -lactoglobulina (β -LG) e baixos níveis de proteínas derivadas do soro, como albumina (ALB), enzimas, imunoglobulinas e proteínas do complemento, fatores de crescimento e lactoferrina (LF). Proteínas e peptídeos de menor abundância associadas à inflamação podem ser detectados em amostras de leite durante a infecção. Esses componentes possuem funções associadas à defesa do hospedeiro e, alguns, propriedades antimicrobianas ^{20,21}.

O sistema imune inato da glândula mamária possui um papel importante na prevenção da mastite e instalação da infecção bacteriana ²². Peptídeos antimicrobianos (PAMs), como a proteína Lactoperoxidase (LPO), a LF, catelicidinas, entre outras, são associados ao epitélio mamário e leucócitos secretados no leite. Os PAMs fazem parte do sistema imune inato e fornecem proteção imediata contra infecções microbianas pela rápida inativação dos patógenos ^{3, 23}.

Avaliações das mudanças na expressão de proteínas do soro de leite proveniente de vacas com mastite podem aumentar o entendimento dos efeitos da composição na produção de derivados lácteos, na biologia mamária, na função imune da glândula mamária, bem como identificar biomarcadores para detecção precoce desta enfermidade ^{5, 24, 25}.

Por definição, um biomarcador é uma característica que pode ser mensurada e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos ou de respostas farmacológicas para intervenções terapêuticas ²⁶. Assim, o estudo de biomarcadores que indiquem a ocorrência de IIM em estágios iniciais da enfermidade é importante, visto que os meios de diagnósticos convencionais detectam a mastite somente quando já estão presentes os sinais clínicos ou a doença encontra-se em estágio avançado ²⁷. Além disso, os biomarcadores têm impacto também no bem-estar animal, quando usados na detecção precoce da enfermidade ²⁶. A investigação dos padrões de expressão de proteínas do soro de leite oriundo de vacas com mastite clínica ou subclínica pode levar ao descobrimento de novos marcadores para mastite, e levar a investigações futuras sobre os efeitos da doença no proteoma do leite bovino ²⁸.

Os testes para identificar indicadores de inflamação podem ser utilizados para rastrear a IIM e selecionar vacas para análise bacteriológica subsequente ²⁹. Esses testes podem ser úteis como parâmetros de prognósticos, para indicar a intensidade da inflamação e monitorar a recuperação da vaca ³⁰. A mudança nos padrões de peptídeos do leite, relacionada a animais com mastite e a animais livres da enfermidade, pode fornecer uma fonte de biomarcadores para a doença. Nesse sentido, o uso de tecnologias avançadas para detecção e análise de peptídeos biomarcadores pode auxiliar no diagnóstico de mastite ³¹.

Dessa forma, o estudo de novos indicadores de inflamação presentes no leite se torna necessário visando auxiliar a identificação específica e sensível de animais infectados ^{5, 29}. Infere-se, portanto, que os biomarcadores presentes no leite constituem uma ferramenta importante na detecção de alterações relacionadas a diferentes condições, como por exemplo, distúrbios da glândula mamária ^{5, 32}.

Objetivou-se com o presente estudo, no aspecto geral, investigar a influência do aumento da CCS na expressão das proteínas do soro de leite por meio da utilização da técnica de separação de proteínas por eletroforese microfluídica em microchip (*lab-on-a-chip*). Nos aspectos específicos, avaliar as alterações dos níveis de proteínas em função de diferentes escores de células somáticas em amostras de leite de vacas, contribuir com o conhecimento da composição proteica do leite e das alterações provocadas pela inflamação, além de identificar potenciais biomarcadores para o diagnóstico de mastites subclínicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estruturação do estudo

Com o objetivo específico de avaliar a correlação entre escores de células somáticas (ECS) e a expressão de proteínas do soro de leite foram realizadas coletas de amostras de leite cru de vacas em lactação em duas propriedades rurais no Estado de Goiás.

Na seleção das duas propriedades foram avaliados o número de animais em lactação, as benfeitorias existentes e a facilidade de acesso. Foram selecionadas duas propriedades, sendo uma localizada no município de Goiânia e outra no município de Goiás. As vacas utilizadas neste estudo eram principalmente das raças Holandesa e vacas mestiças, com média de cinco anos de idade e 19 litros de produção média diária. A coleta das amostras foi realizada em vacas aparentemente saudáveis e que não apresentavam sinais clínicos de doenças, como a mastite. As duas propriedades possuíam sistema de ordenha mecânica provido de medidor e tanque de refrigeração para armazenamento do leite ordenhado.

A propriedade localizada no município de Goiânia possuía 52 vacas em lactação e realizava duas ordenhas por dia em equipamento de circuito fechado. As vacas eram mestiças oriundas de cruzamento entre as raças Holandesa e *Jersey*. Possuíam idade média de 5 anos e produção média diária de 17 litros. A propriedade localizada no município de Goiás possuía 181 vacas em lactação, todas da raça Holandesa, com média de idade de 4 anos e produção média de 23 litros. Destas 181 vacas, 52 eram ordenhadas três vezes ao dia, e 129 eram ordenhadas duas vezes ao dia. Para o presente estudo, foram coletadas amostras de leite das 52 vacas que eram ordenhadas três vezes ao dia. A coleta de amostras de apenas uma ordenha pode ser realizada quando os intervalos entre as ordenhas são iguais. No presente estudo foram coletadas amostras das 52 vacas, na segunda ordenha, visto que o intervalo era de oito (8) horas.

2.2. Coleta de amostras

A coleta das amostras foi realizada entre os meses de janeiro e maio de 2015. Foram coletadas duas unidades de amostras individuais de todas as vacas em lactação das propriedades que participaram do experimento, sendo uma para análise da CCS e composição centesimal e a outra para análise de eletroforese para identificação das proteínas do soro de leite.

Para o teste de correlação entre o perfil de proteínas e a CCS, as amostras foram estratificadas em cinco grupos, descritos no Quadro 1. Foram analisadas 10 amostras em cada grupo. As que apresentaram resultado de até 100.000 cel/mL foram consideradas provenientes de vacas sadias e consideradas como controle.

QUADRO 1: Grupos de divisão das amostras de acordo com a CCS

| Escore de Células Somáticas (ECS) | Faixa de CCS (x1.000 cels /mL) | Número de amostras analisadas em cada grupo |
|-----------------------------------|--------------------------------|---|
| 1 | 0 – 100 | 10 |
| 2 | 101 – 200 | 10 |
| 3 | 201 – 500 | 10 |
| 4 | 501 – 1.000 | 10 |
| 5 | + 1.000 | 10 |

2.3. Amostra individual de leite para análise

As amostras individuais de leite de cada vaca foram representativas de uma ordenha completa de cada animal, em um período de 24 horas. A coleta do leite em ordenhadeira mecânica de circuito fechado foi realizada com o auxílio de medidores. Após a ordenha completa, o leite foi agitado por meio da permissão de entrada de ar no medidor; a válvula então foi aberta, sendo o volume de 40 mL de leite vertido nos frascos de coleta. A coleta foi realizada em duplicata, sendo que um dos frascos continha uma pastilha de Bronopol® (D&F Control Systems, Dublin) para a conservação do leite visando à análise de CCS e de composição centesimal e outra não continha conservante e destinava-se a análise de proteínas.

As amostras foram transportadas ao laboratório, logo após a coleta, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. Os frascos contendo o conservante foram encaminhados ao Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LQL/CPA/EVZ/UFG) para a realização das análises de CCS e composição centesimal. Já os frascos que não continham conservantes foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos Multiusuário do Centro de Pesquisa em Alimentos da EVZ/UFG.

Antes do armazenamento, as amostras de leite cru sem conservantes foram centrifugadas 2.500xG e desnatadas. Em seguida foram armazenadas em congeladores à temperatura de -80°C para posterior realização da análise de proteinograma.

2.4. Contagem de Células Somáticas e Análise de Composição Centesimal

A Contagem de Células Somáticas (CCS) foi realizada em equipamento Fossomatic 500 Basic® (FOSS ELECTRIC A/S, HILLEROD, DINAMARCA, 2000), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo, sendo o resultado expresso em células/mL³³.

A análise de Composição Centesimal foi realizada em equipamento Milkoscan 4000® (FOSS ELECTRIC A/S, HILLEROD, DINAMARCA, 2000), cujo princípio analítico baseia-se na absorção diferencial de ondas infravermelhas pelos componentes do leite³³.

2.5. Análise do proteinograma do leite

A análise de separação das proteínas, denominada de proteinograma, das amostras de leite foi realizada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) utilizando o Agilent Protein Kit 230, capaz de identificar e quantificar proteínas com peso molecular entre 14 e 230 kDa. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O princípio analítico do ensaio utilizado para a separação das proteínas do soro das amostras de leite de vacas foi a eletroforese microfluídica em *microchip (lab-on-a-chip)*.

Os reagentes que compunham o Kit para realização das análises consistiam em um gel matriz (*Protein 230 Gel-Matrix*), um corante concentrado (*Protein 230 Dye Concentrate*), uma solução tampão (*Protein 230 Sample Buffer*) e um marcador de peso molecular para proteínas de 14 a 230 kDa (*Ladder*), além do *chip* no qual a eletroforese foi realizada. Esses reagentes são substratos para o preparo das soluções de gel-corante (*Gel-Dye Mix*), solução de descoloração (*Destaining Solution*) e solução de desnaturação (*Denaturing Solution*) (Quadro 2).

Quadro 2: Modo de preparo e condições de armazenamento do *Agilent Protein Kit 230*

| Solução | Modo de Preparo | Condições de armazenamento |
|----------------------------|--|---|
| <i>Gel-Dye Mix</i> | Primeiro, deve-se adicionar 25µL da solução <i>Protein 230 dye concentrate</i> em 650 µL da solução <i>Protein 230 gel matrix</i> . Em seguida a mistura deve ser homogeneizada em vórtex por 15 segundos. A mistura é transferida para um microtubo de 2 mL com filtro e centrifugada a 2.500 x g por 15 minutos. Está pronta para uso. | A solução deve ser identificada e armazenada a 4°C. Possui validade de quatro semanas. O volume é compatível com a utilização em 10 <i>microchips</i> (100 amostras). |
| <i>Destaining Solution</i> | Deve-se transferir 650 uL da solução <i>Protein 230 gel matrix</i> para um microtubo de 20 mL com filtro. Em seguida, a solução deve ser centrifugada a 2.500xg por 15 minutos. | A solução deve ser identificada e armazenada a 4°C. Um frasco preparado comporta a utilização do kit. |
| <i>Denaturing Solution</i> | Deve ser adicionado 7µL de β-mercapto-etanol em um frasco de 200 uL de <i>Protein 230 Sample Buffer</i> em seguida, proceder homogeneização em vortex. | A solução deve ser identificada e armazenada a 4°C. O volume é compatível com a utilização em 10 <i>microchips</i> (100 amostras) |

As soluções preparadas foram armazenadas a 4°C para evitar desvios de resultados devido a decomposição dos reagentes. Os frascos contendo os reagentes também foram protegidos com papel aluminizado, uma vez que o corante pode se decompor devido a exposição à luz.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com o manual do equipamento, no qual 4µL da amostra de leite foram adicionados a 2µL da *Denaturing Solution*. Essa nova solução foi aquecida em placa aquecedora a 95°C por 5 minutos e em seguida a amostra foi resfriada e homogeneizada por 15 segundos. Ao final, adicionou-se 84µL de água deionizada. O preparo do *ladder* utilizado em cada *chip* ocorreu de forma similar, no qual 6 µL de *ladder* foi aquecido em placa aquecedora a 95°C e homogeneizado por 15 segundos. Posteriormente, adicionou-se 84 µL de água deionizada.

Após o preparo dos reagentes, deu-se início às análises do proteinograma. As amostras de leite foram descongeladas e distribuídas em tubos polipropileno de 1,5mL Em seguida, foram congeladas novamente à temperatura de -20°C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos antes do

início das análises propriamente ditas. As amostras foram analisadas em duplicata. Os reagentes também foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente antes do início do preparo do *microchip*.

A distribuição dos reagentes e das amostras seguiu a indicação alfanumérica apresentada nos *microchips* (Figura 1). Primeiro, o *microchip* foi colocado em um suporte (*Microchip Priming Station*) que auxilia na aplicação de pressão para distribuição homogênea do gel. Em seguida, foram adicionados 12 μ L do *Gel-Dye-Mix* no poço G1 e aplicada pressão com auxílio de uma seringa de 1 mL. Após 60 segundos foi adicionado em cada poço G2, G3 e G4, 12 μ L do *Gel-Dye-Mix*. Posteriormente foram adicionados 12 μ L do *Destaining Solution* no poço DS.

Uma alíquota de 6 μ L de cada amostra foi dispensada nos poços identificados como S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 e S10. O *Ladder* foi adicionado ao poço L.

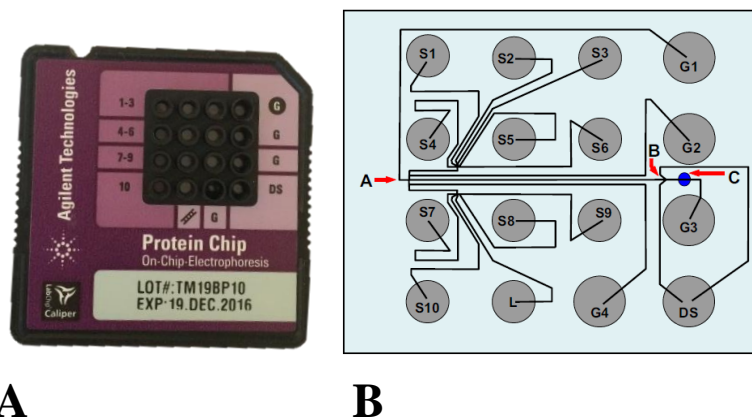


FIGURA 1: (A) *Chip* utilizado para realização da análise de eletroforese microfluídica (Agilent 2100 Bioanalyzer®). Capacidade para 10 amostras. (B) Representação gráfica dos poços e canais de um *chip* para eletroforese microfluidica. Os poços G1-G4 foram preenchidos com *Gel-Dye Mix*; DS foi preenchido com *Destaining Solution*; S1-S10 preenchidos com amostras; e L preenchido com *Ladder*. A seta de letra (A) indica os canais de separação, a letra (B) posição de descoloração; e a letra (C) posição da janela de detecção.

FONTE: (A) Arquivo Pessoal; (B) Adaptado de Anema (2009).

Uma vez preparado, o *microchip* foi inserido no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* e iniciada a eletroforese microfluídica. Cada corrida eletroforética durou aproximadamente 30 minutos.

As análises de eletroforese microfluídica tiveram padrões conhecidos por meio da corrida de proteínas purificadas: albumina (ALB), α -lactalbumina bovina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), lactoferrina (LF) e imunoglobulina G (IgG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (Figura 2).

A identificação das proteínas do soro presentes nas amostras de leite de vacas foi determinada pela migração no gel, sendo observados os parâmetros de peso molecular e tempo de corrida no gel e no Eletroferograma, produzidos através da fluorescência das proteínas e dos marcadores de peso molecular. Os picos obtidos pela eletroforese foram gerados automaticamente e captados pelo *software*. Após o término da análise, o *microchip* utilizado foi removido, descartado e os eletrodos higienizados por meio da adição de 350 μ L de água ultrapura no sistema *eletrode cleaner*.

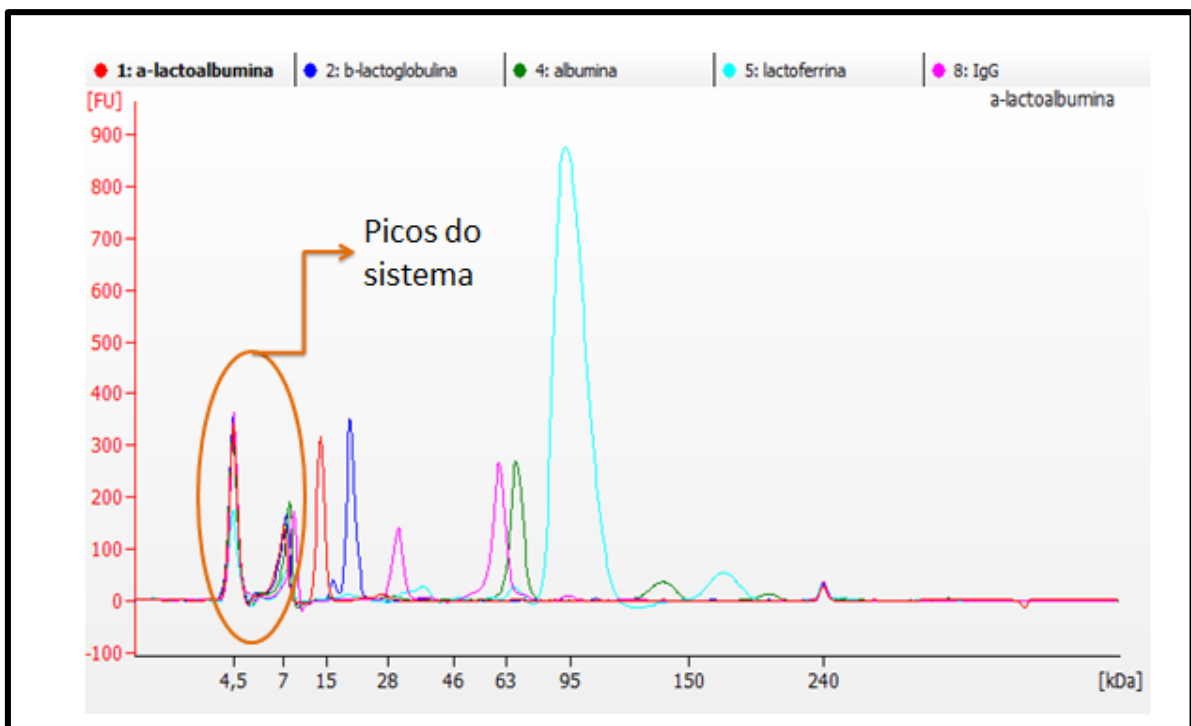


Figura 2: Representação gráfica dos picos de proteínas purificadas (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina, lactoferrina e IgG) e respectivo peso molecular (kDa).

Ao término da análise, fez-se a leitura do eletroferograma do *Ladder* para certificar a eficiência da análise e a robustez dos resultados (Figura 3). Na leitura foram observados: a) os marcadores de menor e maior peso molecular (*Lower Marker* e *Upper Marker*, respectivamente); b) os sete picos de proteínas, c) a base do eletroferograma que

deve ser limpa, lisa e sem ruídos; sendo que cada pico deve ter pelo menos 20 unidades de fluorescência (FU) maior que o registrado na base.

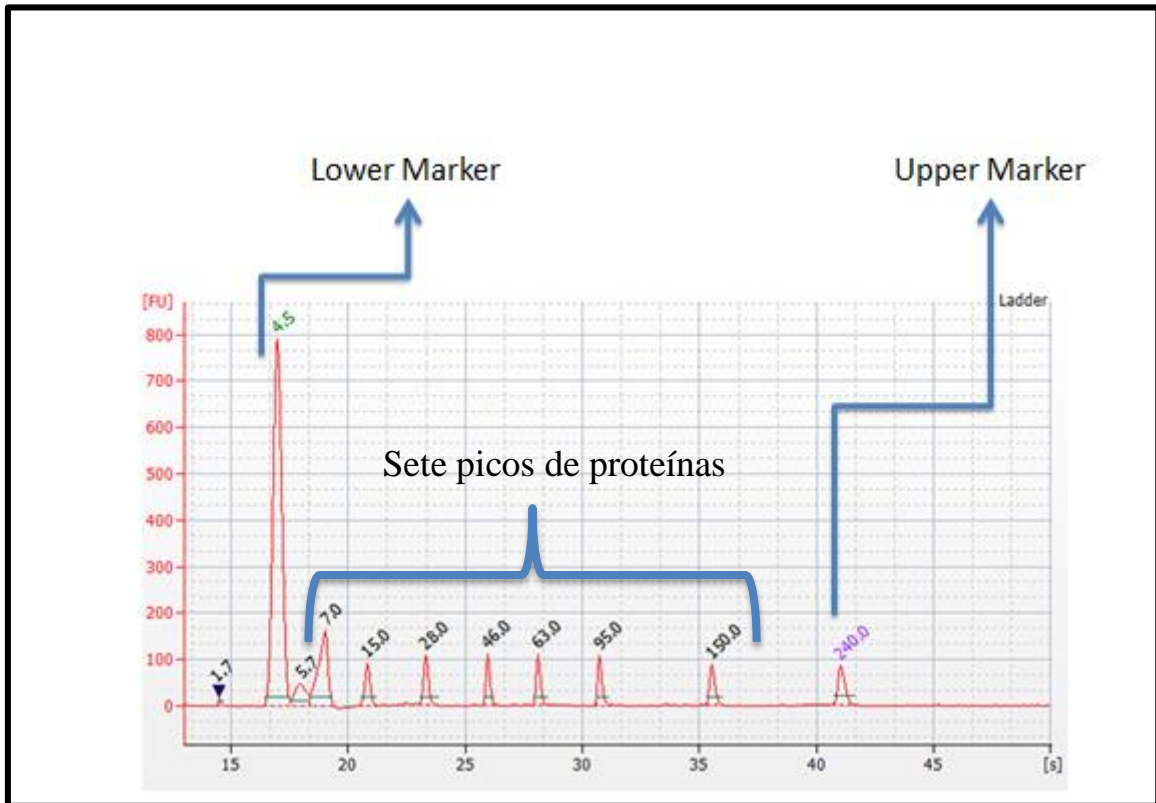


FIGURA 3: Eletroferograma do marcador de peso molecular *Ladder*, controle da reação.

A partir dos resultados da eletroforese microfluídica e da avaliação dos eletroferogramas foi possível identificar as proteínas do soro do leite. Para tanto, os picos de proteínas identificados nas amostras foram comparados com resultados de análise de eletroforese microfluídica de padrões de proteínas purificadas e com padrões de proteínas identificadas da literatura (Quadro 3).

Quadro 3: Proteínas do soro e peso molecular correspondente

| Proteína | Padrão de Peso Molecular |
|--|--------------------------|
| α - lactalbumina (α -LA) | 14 kDa* |
| β -lactoglobulina Pico 1 (β -LG pico 1) | 16,5 kDa* |
| β -lactoglobulina Pico 2 (β -LG pico 1) | 19,9 kDa* |
| IgG cadeia leve | 30,8 kDa* |
| IgG cadeia pesada | 60,8 kDa* |
| IgM | 70kDa*** |
| Albumina (ALB) | 67,8 kDa* |
| Lactoperoxidase (LPO) | 80kDa** |
| Lactoferrina (LF) | 93 kDa* |

Fonte: *Padrões de peso molecular informados pelas proteínas purificadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); ** Che et al. ⁴⁷; *** Hurley e Theil ⁴⁸.

2.6. Análise estatística

Para análise dos dados obtidos, os valores referentes à CCS foram transformados em dados de logaritmo (\log_{10}), uma vez que a CCS não possui distribuição normal.

Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos com dez repetições, no qual cada grupo de variação da CCS foi considerado um tratamento. Os dados foram analisados utilizando a estatística descritiva e representações gráficas. A análise de variância (ANOVA) com um fator fixo foi utilizada para avaliar as modificações das proteínas do soro de leite em relação ao escore de células somáticas, seguida do teste *post-hoc* Mann-Whitney U (comparação 2 a 2) para a identificação das diferenças específicas nas variáveis em questão, seguindo o critério de significância estatística estabelecido ($p \leq 0,05$).

Para avaliação dos dados de composição centesimal em função da CCS foi utilizado o Teste T de Student bicaudal.

Os programas utilizados para a realização das análises estatísticas foram SPSS-version 19.0 e software R (2009) ³⁴.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição Centesimal e CCS

As amostras de leite cru foram separadas em cinco grupos de acordo com os resultados de CCS obtidos nos ensaios analíticos. Os resultados de composição centesimal de cada escore de células somáticas (ECS) podem ser visualizados na Tabela 1. Segundo Machado et al.³⁵, as principais alterações na composição do leite em casos de mastite subclínica são a diminuição nos teores de gordura, lactose e extrato seco e aumento nos teores de proteína.

Ao se compararem os resultados de composição centesimal entre os ECS, um a um, pelo teste estatístico T de *Student*, verificou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no valor do componente Proteína, notadamente entre os ECS 1 e 3, 1 e 4 e 1 e 5. Resultados de estudos concernentes à alteração dos níveis de proteínas do soro em amostras de leite são controversos. Alguns autores afirmam que há aumento da concentração do teor de proteína de acordo com o aumento da CCS³⁶⁻³⁹. Outros, entretanto, observaram diminuição dos níveis de proteína em amostras de leite com altas contagens de CCS^{33,35}. Ademais, há autores que não observaram variação significativa da proteína total⁴⁰.

No presente estudo também foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos resultados do componente Lactose quando se compararam os ECS 1 e 4 e 3 e 4. Tais resultados são corroborados por outros estudos, nos quais também foi possível observar redução dos níveis de lactose nas amostras de leite de vacas com mastite subclínica^{33, 35, 41}.

Os resultados obtidos para o teor de proteínas do soro de leite e para o teor de lactose eram esperados, uma vez que a mastite, caracterizada como um processo inflamatório e infeccioso, altera a composição do leite. A permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula mamária é alterada, bem como a habilidade de síntese do tecido excretor³⁵. Vale ressaltar que a comparação realizada no presente estudo teve como base amostras controle, provenientes de leite de vacas sadias, ou seja, amostras de leite com CCS de até 100.000 cel/ mL – ECS 1 e amostras de leite de vacas com mastite subclínica, ou seja, amostras com CCS acima de 200.000 cel/ mL – ECS 3, ECS 4 e ECS 5.

Tabela 1: Análise descritiva da composição centesimal e escore de célula somática, Goiânia-GO, 2017.

| Variável | Escore | Nº de amostras | Média (%) | Desvio-Padrão |
|--------------------|--------|----------------|-----------|---------------|
| Gordura | 1 | 10 | 2,703 | 0,96 |
| | 2 | 10 | 4,304 | 1,91 |
| | 3 | 10 | 4,351 | 1,25 |
| | 4 | 10 | 3,996 | 1,01 |
| | 5 | 10 | 4,243 | 1,42 |
| Proteína | 1 | 10 | 2,942 | 0,32 |
| | 2 | 10 | 3,115 | 0,61 |
| | 3 | 10 | 3,478 | 0,42 |
| | 4 | 10 | 3,668 | 0,63 |
| | 5 | 10 | 3,35 | 0,50 |
| Lactose | 1 | 10 | 4,592 | 0,26 |
| | 2 | 10 | 4,476 | 0,34 |
| | 3 | 10 | 4,53 | 0,21 |
| | 4 | 10 | 4,114 | 0,21 |
| | 5 | 10 | 4,089 | 0,44 |
| Extrato Seco Total | 1 | 10 | 11,278 | 1,01 |
| | 2 | 10 | 12,968 | 1,96 |
| | 3 | 10 | 13,377 | 1,32 |
| | 4 | 10 | 12,67 | 1,45 |
| | 5 | 10 | 12,639 | 1,69 |

Com a IIM ocorre diminuição da síntese celular e da síntese proteica. No entanto, o aumento da permeabilidade vascular do epitélio da glândula mamária, ocasionado pelo processo inflamatório, permite a passagem direta de proteínas do sangue para o leite. O aumento do teor de proteínas nas amostras de leite de vacas com mastite deve-se ao aumento dos níveis de proteínas de defesa, relacionadas à imunidade da glândula mamária, uma vez que as proteínas próprias do leite, como a caseína, diminuem. Assim, a quantidade de proteína nas amostras de leite de vacas com mastite pode aumentar, principalmente em função das

proteínas provenientes da corrente sanguínea que podem compensar as perdas provocadas pelo decréscimo da síntese proteica da glândula mamária ³⁹.

De acordo com Gigante et al. ³⁹, a alteração nos níveis de lactose também ocorrem em amostras de leite com altas CCS devido à alteração do epitélio, que nesta condição não regula as trocas entre o lúmen alveolar e a circulação sanguínea, permitindo o livre trânsito da lactose e sais. A elevação da concentração de sais, como sódio e cloro, desencadeia, provavelmente, a elevação da pressão osmótica do leite, o que leva à redução da concentração da lactose. Outras causas da diminuição da concentração da lactose seriam resultado da síntese diminuída deste carboidrato pela glândula mamária em função da IIMs; da utilização da lactose como fonte de energia pelos patógenos intramamários; e da perda de lactose da glândula para a corrente sanguínea, devido ao aumento da permeabilidade da membrana, que separa o leite do sangue, levando à excreção da mesma na urina ³⁵.

3.2. Identificação das proteínas do soro de leite em função dos Escores de Células Somáticas (ECS)

A utilização de métodos com capacidade para separação, identificação e quantificação das proteínas fornecem informações importantes sobre as propriedades físico-químicas do leite que podem ser influenciadas por diferentes sistemas de produção leiteiros ⁴². Desta forma, a tecnologia de eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* vem sendo utilizada em diversos estudos com o intuito de verificar a eficiência dessa técnica na avaliação da distribuição de diferentes frações proteicas do leite ⁴²⁻⁴⁶.

O método de eletroforese microfluídica tem sido relatado como uma boa alternativa para o método tradicional de Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os estudos de Anema ⁴³ e Costa et al., ⁴² tiveram como objetivo determinar a eficiência da técnica de eletroforese microfluídica quando utilizada para separação e quantificação das proteínas maiores/ alta abundância do leite em comparação à técnica SDS-PAGE. Ambos os autores concluíram que a técnica de eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* constitui uma alternativa prática e rápida para a separação simultânea das proteínas a grande abundância do soro do leite.

A eletroforese microfluídica também foi utilizada com sucesso em estudos para identificação de fraudes em leite de cabra por leite de vacas ^{44, 45} a partir da identificação das frações proteicas da Kappa-Caseína no leite de vaca. Em outro estudo, foi possível realizar a caracterização proteica do leite de vacas de raças regionais, raça Curraleiro Pé-Duro e raça Pantaneira, do Centro-Oeste brasileiro ⁴⁶.

Tais estudos corroboram com os resultados aqui obtidos, uma vez que demonstram a eficiência da metodologia empregada para separação, identificação e quantificação das proteínas do soro do leite de vacas.

No presente estudo, a análise de eletroforese microfluídica foi realizada em amostras de leite fluido desnatado, sem o procedimento de coagulação das proteínas e separação do soro, ao contrário dos procedimentos realizados pelos demais autores citados. A identificação com eficiência das proteínas do soro de leite nas amostras utilizadas no presente estudo indica uma alternativa para o preparo de amostras e a realização de eletroforese microfluídica, otimizando o tempo de análise.

3.3. Perfil de proteínas expressas nas amostras de leite de acordo com cada grupo de Escore de Células Somáticas

Ao comparar a média da concentração das proteínas expressas nas amostras de leite de cada grupo de ECS (Tabela 2), foi possível observar que não há evidência estatística ($p \geq 0,05$) de que a concentração total das proteínas expressas em um grupo de ECS seja diferente da concentração das proteínas expressas em outro grupo de ECS. A apresentação gráfica da variação da concentração total de proteínas dos grupos de ECS pode ser visualizada na Figura 4.

Apesar do valor total da concentração das proteínas dos ECS não apresentar diferença estatística, foi possível observar que, a partir da análise da variável Concentração (Tabela 2), a concentração total das proteínas das amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (ECS 3 – 5) revelou-se numericamente menor que a concentração das proteínas das amostras dos ECS 1 e 2.

No entanto, foi possível observar um aumento do número de proteínas identificadas nas amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica, uma vez que as amostras dos ECS 3, 4 e 5 apresentaram 122, 119 e 136 proteínas, respectivamente; enquanto que nas amostras do ECS 1 foi possível identificar 107 proteínas, e nas do ECS 2, 105 proteínas. Os eletroferogramas das amostras de cada ECS podem ser visualizados na Figura 5.

Das análises dos resultados obtidos (Tabela 2) pode-se constatar que, por ocasião de uma IIM, ocorre o aumento do número de proteínas na glândula mamária e, conseqüentemente, no leite, no entanto, tem-se a diminuição da concentração total das proteínas presentes no leite. Isso pode ser devido ao aumento do número das proteínas de defesa, ou seja, durante uma IIM, uma grande quantidade de diferentes proteínas de defesa,

como as proteínas de fase aguda (PFA), peptídeos antimicrobianos (PAMs), imunoglobulinas, entre outras, são sintetizadas a fim de eliminar a infecção na glândula mamária ⁴⁹.

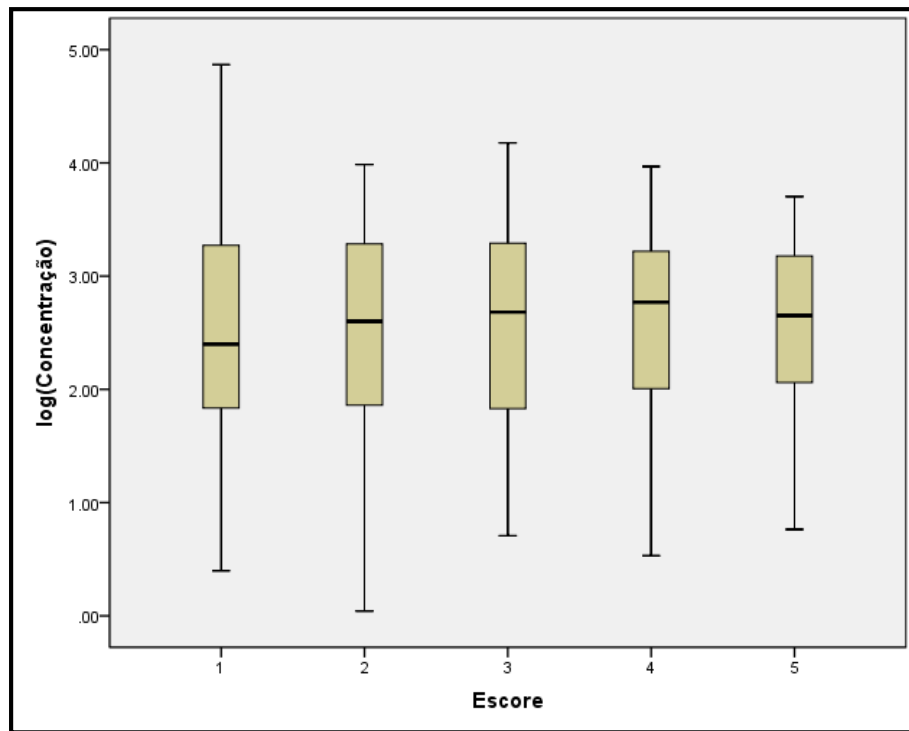


Figura 4: Representação gráfica da concentração total das proteínas expressas nos grupos de ECS.

Tabela 2: Análise descritiva da diferença de concentração das proteínas totais expressas nas amostras em função dos Escores de Célula Somática, Goiânia-GO, 2017.

| | Escore | N° proteínas identificadas | Média | Desvio-padrão | Log (concentração) | |
|----------------------|--------|----------------------------|---------|---------------|--------------------|---------------|
| | | | | | Média | Desvio-padrão |
| Concentração (ng/uL) | 1 | 107 | 2486,44 | 7908,40 | 2,49 | 0,97 |
| | 2 | 105 | 1267,17 | 1788,52 | 2,54 | 0,85 |
| | 3 | 122 | 1399,00 | 2435,86 | 2,52 | 0,88 |
| | 4 | 119 | 1120,30 | 1423,50 | 2,58 | 0,78 |
| | 5 | 136 | 946,63 | 1092,32 | | |

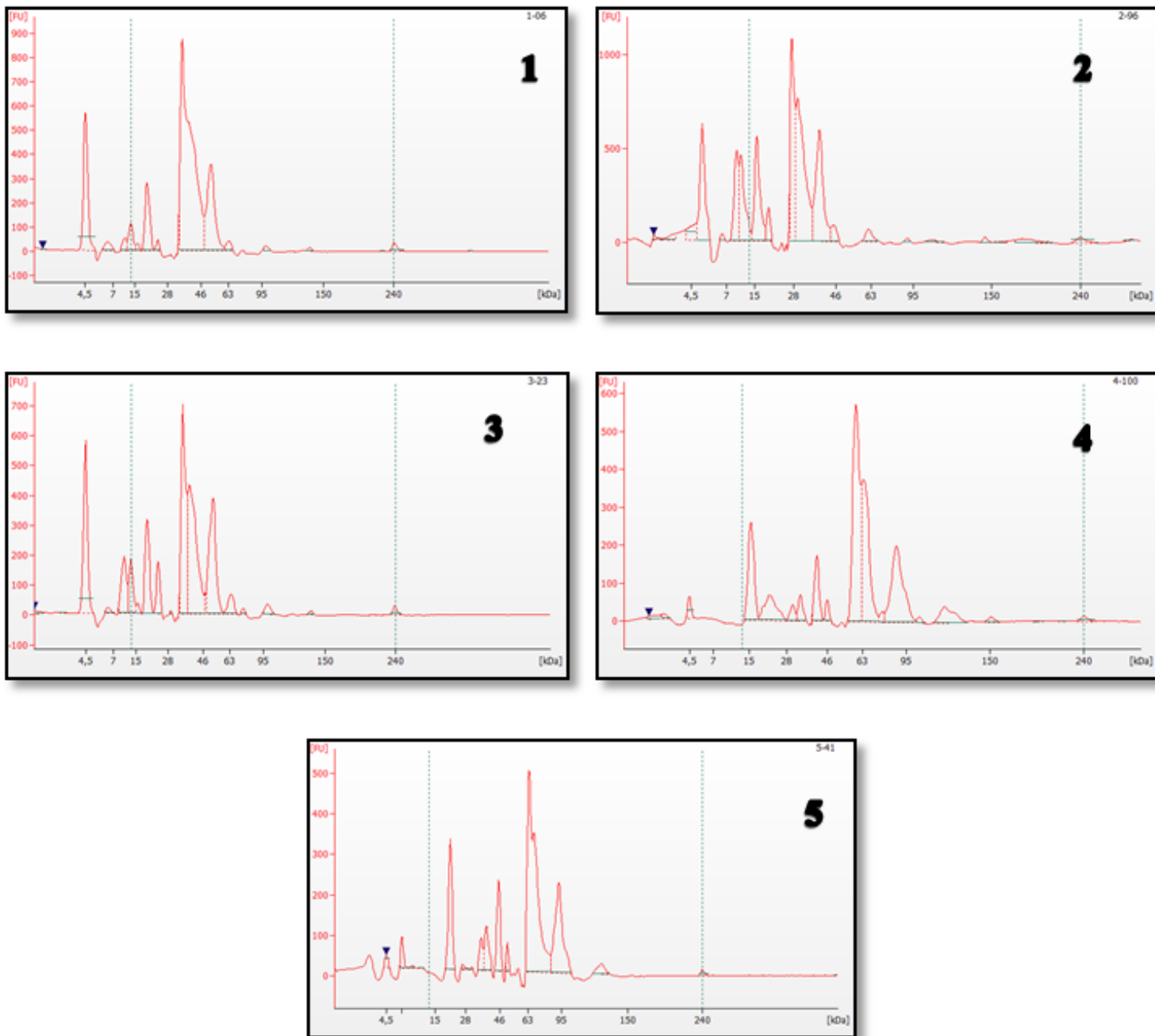


Figura 5 - Eletroferogramas de amostras de leite de vacas com ECS de 1 a 5. Sendo Fu: Unidade de Fluorescência e kDa: quilo Dalton.

Amostras de leite de vacas com mastite possuem maior diversidade de proteínas, no entanto são proteínas de pequena abundância, uma vez que são proteínas de defesa e com atividades antimicrobianas e inflamatórias. Já amostras de leite de vacas sem mastite (ECS 1 e 2) possuem grande quantidade de proteínas de alta abundância, como α -LA e β -LG. Nesse sentido, o aumento do número de proteínas e a diminuição numérica da concentração total de

proteínas podem estar relacionados ao estado sanitário e inflamatório das glândulas mamárias das vacas que originaram as amostras.

Guerrero et al. ⁵⁰ obtiveram resultado semelhante ao presente estudo, ao verificar um aumento na produção de peptídeos derivados de proteínas em amostras de leite de vacas com mastite subclínica quando comparado com as amostras de leite de vacas com mastite clínica. Em outro estudo, Mansor et al. ³¹ também obtiveram resultados semelhantes, ao observar um aumento da concentração dos peptídeos em amostras de leite de vacas com mastite em relação às amostras de leite de vacas sadias.

3.4. Avaliação descritiva por Escore de Células Somáticas e proteínas

Na avaliação descritiva da variável “Concentração” das proteínas do leite foi possível observar diferenças nos valores das concentrações em função do ECS (Tabela 3). Os resultados da variável “concentração” da proteína α -LA obtidos de amostras que apresentaram ECS 1, 2 e 3 foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos resultados obtidos das amostras de ECS 5. Na avaliação da proteína IgG foi possível observar que as amostras de ECS 4 e 5 apresentaram concentrações estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) das amostras dos ECS 1, 2 e 3. Para a proteína LF, foi possível observar diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos das amostras de ECS 1 e 5 (Tabela 3).

Tabela 3: Análise descritiva da variável concentração das proteínas identificadas nas amostras de leite, Goiânia-GO, 2017.

| Proteína | Variável | escore | N | Média da concentração | Desvio-padrão | |
|-------------------------|-------------------------|--------|----|-----------------------|---------------|-------|
| α -LA | Concentração (ng/uL) | 1 | 10 | 3298.69 | 1037.83 | a |
| | | 2 | 8 | 1460.19 | 1472.79 | a |
| | | 3 | 10 | 1169.92 | 1340.94 | a |
| | | 4 | 9 | 1048.06 | 876.71 | a, ab |
| | | 5 | 10 | 436.96 | 909.20 | ab, b |
| ALB | Concentração (ng/uL) | 1 | 7 | 2534.34 | 4931.58 | a |
| | | 2 | 8 | 1112.48 | 1446.05 | a |
| | | 3 | 9 | 767.49 | 1236.31 | a |
| | | 4 | 6 | 2306.43 | 859.98 | a |
| | | 5 | 10 | 1952.49 | 655.56 | a |
| β -LG – pico 1 | Concentração(ng/uL) | 1 | 9 | 1470.44 | 2478.91 | a |
| | | 2 | 10 | 1089.41 | 1193.30 | a |
| | | 3 | 10 | 1574.81 | 1736.43 | a |

| | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|---|----|---------|---------|-------|
| | | 4 | 10 | 1303.45 | 1138.07 | a |
| | | 5 | 10 | 379.90 | 393.11 | a |
| β- LG – pico 2 | Concentração(ng/uL) | 1 | 10 | 734.57 | 1259.18 | a |
| | | 2 | 10 | 612.34 | 537.59 | a |
| | | 3 | 9 | 539.24 | 572.77 | a |
| | | 4 | 10 | 333.23 | 263.03 | a |
| | | 5 | 10 | 352.01 | 185.80 | a |
| IgG cadeia leve | Concentração (ng/uL) | 1 | 10 | 1379.36 | 693.31 | a |
| | | 2 | 10 | 1199.12 | 174.66 | a |
| | | 3 | 10 | 3432.22 | 2492.01 | a |
| | | 4 | 10 | 3606.30 | 3770.01 | b |
| | | 5 | 10 | 4987.57 | 3329.29 | b |
| IgG cadeia pesada | Concentração (ng/uL) | 1 | 10 | 1265.75 | 928.28 | a |
| | | 2 | 9 | 2489.59 | 1754.24 | a |
| | | 3 | 10 | 2452.98 | 476.70 | a |
| | | 4 | 9 | 2588.91 | 1170.26 | b |
| | | 5 | 10 | 3394.80 | 3107.15 | b |
| IgM | Concentração (ng/uL) | 1 | 3 | 1921.93 | 859.24 | a |
| | | 2 | 3 | 1383.07 | 1154.64 | a |
| | | 3 | 2 | 1957.85 | 200.32 | a |
| | | 4 | 4 | 2027.03 | 580.19 | a |
| | | 5 | 9 | 1745.37 | 648.83 | a |
| LF | Concentração (ng/uL) | 1 | 10 | 83.83 | 200.76 | a, ab |
| | | 2 | 9 | 170.02 | 209.05 | ab |
| | | 3 | 10 | 268.55 | 287.15 | ab |
| | | 4 | 9 | 1009.96 | 1525.96 | ab |
| | | 5 | 10 | 709.83 | 1501.06 | ab, b |
| LPO | Concentração (ng/uL) | 1 | 4 | 75.45 | 40.95 | a |
| | | 2 | 5 | 960.78 | 2042.86 | a |
| | | 3 | 10 | 410.27 | 1112.54 | a |
| | | 4 | 8 | 1906.41 | 3574.70 | a |
| | | 5 | 6 | 3065.52 | 7361.42 | a |

Legenda: A diferença estatística entre as médias está representada por letras diferentes. Letras iguais não apresentam diferença estatística (valor $p \geq 0,05$).

Ao avaliar a proteína α -LA observa-se que ocorre diminuição na concentração desta proteína em função do ECS, ou seja, a concentração da α -LA em amostras de leite de vacas sadias no ECS 1, foi maior que a concentração desta mesma proteína em amostras de leite de ECS 3, 4 e 5, oriundos de vacas com mastite subclínica. No presente estudo, a

concentração da proteína α -LA apresentou resultados estatisticamente diferentes (valor $p \leq 0,05$) quando se comparou os ECS 1, 2 e 3 com ECS 5.

Relativamente a proteína β -LG, sabe-se que sua concentração diminui à medida que se tem um quadro indicativo de IIM. Em vacas sadias é a proteína do soro de leite de maior concentração, sendo seguida pela α -LA. Devido às suas propriedades de ligação, muitos estudos indicam sua função como importante papel no transporte de retinol, ácidos graxos ou vitamina A^{28, 51-53}.

Os resultados obtidos para α -LA e β -LG eram esperados, uma vez que ambas são as proteínas do soro de leite de maior abundância em leite de vacas sadias. Os resultados obtidos no presente estudo para as duas proteínas são semelhantes aos obtidos por Hogarth et al.¹; Li et al.²⁸, Thomas et al.⁴. Esses autores também observaram diminuição dos teores das proteínas α -La e β -LG em amostras de leite de vacas com mastite.

Segundo Guerrero et al.,⁵⁰ a diminuição dos níveis das proteínas α -LA e β -LG pode ser decorrente tanto do aumento da atividade de proteases no leite de vacas com mastites, quanto da diminuição na síntese dessas proteínas durante as mastites, ou seja, do aumento da síntese de proteínas de defesa.

Na avaliação da proteína ALB, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os resultados e concentrações dessa proteína em função dos ECS, foi possível observar uma diminuição numérica de concentração à medida em que o ECS aumentou. Sadek et al.⁵⁴, também observaram diminuição na concentração da ALB em amostras de leite de vacas com mastite subclínica quando comparadas com amostras de leite de vacas sadias.

De acordo com Tothova et al.⁵⁵, a diminuição de concentração de ALB está relacionada com a resposta da fase aguda (RFA). Segundo esses autores, durante a RFA a demanda por aminoácidos para síntese das proteínas de fase aguda (PFA) positivas é aumentada, com isso, ocorre um rearranjo da síntese proteica hepática e priorização da síntese de PFA positivas. Como a ALB é uma proteína de fase aguda negativa, a síntese é diminuída e os aminoácidos são direcionados para a síntese de PFA positivas.

Na avaliação da proteína IgG foi possível observar um aumento de suas concentrações em função do aumento dos ECS. Musayeva et al.¹⁶ também observaram aumento na concentração de IgG nas amostras de leite de vacas com mastite subclínica, ou seja, em amostras de leite com CCS maior que 200.000cel/mL. O aumento da concentração de Imunoglobulinas pode ser em decorrência do aumento da permeabilidade dos vasos

sanguíneos do úbere por ocasião da infecção^{16, 56, 57}. O aumento da concentração das Imunoglobulinas indica atividade da resposta imune¹⁶.

Quando se comparam os resultados obtidos para a concentração da proteína LF em função dos grupos de ECS, os dados do presente estudo são corroborados por diversos outros estudos^{4, 16, 22, 28, 54, 58-62}. Todos estes autores observaram aumento na concentração da proteína LF de acordo com a ocorrência de mastites, ou seja, vacas com IIMs apresentaram concentração da LF no leite maior que em vacas sadias.

A proteína LF integra o sistema imune inato da glândula mamária de vacas, sendo classificada como um peptídeo antimicrobiano. Sua principal função antimicrobiana está relacionada à capacidade de ligação aos íons de ferro livre no ambiente. Assim, os íons ferros são sequestrados, tornando-se indisponíveis para utilização no metabolismo microbiano, o que leva à inibição do desenvolvimento de bactérias, bolores e fungos. Outros mecanismos bactericidas da LF estão relacionados à possibilidade de aderência à parede bacteriana, ocasionando injúria celular, levando à morte ou diminuição da resistência^{22, 23, 63-66}.

Os resultados de CCS vêm sendo correlacionados positivamente com mastites subclínicas e concentração de lactoferrina⁵⁸⁻⁶⁰. De acordo com Chopra et al.⁶⁰, diferentes concentrações de LF são encontradas quando se comparam resultados de amostras de leite de vacas sadia com amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, sendo observado uma maior expressão genética do gene da LF em vacas com mastites. Devido ao importante papel desempenhado pela LF na saúde da glândula mamária, essa proteína pode ser considerada um biomarcador promissor para mastite e uma potencial candidata na seleção animal para resistência de mastites^{60, 65}.

Relativamente à proteína IgG, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) em sua concentração em amostras de leite de vacas com mastite subclínica, pertencente aos ECS 4 e 5 (CCS acima de 500.000 cel/mL) quando comparadas com amostras de leite de vacas sadias (CCS até 200.000 cel/mL) e com amostras de leite de vacas com mastite subclínica de intensidade leve (CCS entre 200 e 500.000 cel/mL). A IgG é um componente do sistema imune da glândula mamária e auxilia na remoção de substâncias não próprias aos organismos, além de exibir atividade antimicrobiana em leite de vacas contra bactérias patogênicas⁶⁷. Em casos de infecções pode-se observar um aumento na concentração de IgG em amostras de leite de vacas. Apesar do aumento da concentração ter sido relacionado à transferência da imunoglobulina do sangue para a glândula mamária, a

alteração dos níveis da proteína IgG se dá por estímulo à síntese proteica local devido a presença do patógeno ^{48, 68, 69}.

A proteína IgG é conhecida por fazer parte da imunidade passiva, como proteína de defesa, transferida do leite colostrado ao bezerro. Auxilia, juntamente com a proteína LF, na proteção do neonato contra infecções, até que consiga desenvolver seu próprio sistema imunológico ^{48, 67}. A elevação da concentração da IgG em amostras de leite de vacas com mastite vem sendo observada em outros estudos ^{68, 69}. Apesar de a proteína LF ser considerada, por outros autores, um biomarcador potencial para mastite, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a proteína IgG pode ser também um excelente marcador. No presente estudo verificou-se que a diferença nos níveis de concentração da proteína IgG foi observada em amostras de leite de vacas com mastite subclínica com CCS acima de 500.000cel/mL, enquanto que a diferença na concentração nos níveis da proteína LF foi observada em amostras de leite de vacas com mastite subclínica com CCS acima de 1.000.000 cél/mL. Infere-se, portanto, que a IgG é um marcador mais sensível que a proteína LF.

Na avaliação dos resultados da concentração da proteína LPO (Tabela 3), pode-se observar um aumento numérico em sua concentração em função do aumento do ECS, ou seja, as amostras de leite de vaca com mastite subclínica, com resultado de CCS acima de 500.000 cel/mL, apresentaram as maiores concentrações de LPO. Os estudos de Kawai et al. ²²; Zhang et al. ⁴⁰ corroboram os resultados obtidos neste estudo. Assim como a LF, a LPO também é classificada como um peptídeo antimicrobiano, tendo papel importante no Sistema Imune Inato da glândula mamária.

Os dados do presente estudo revelam que, ao se comparar resultados de amostras de leite de vacas sadias e resultados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, a diferença não está na expressão nem na produção das proteínas, mas sim em suas concentrações em função do *status* sanitário da glândula mamária. Ou seja, é possível identificar a maioria das proteínas em todas as amostras de leite analisadas, no entanto, a diferença está no resultado de suas concentrações em função dos ECS.

4. CONCLUSÃO

- Em amostras de leite com altas CCS, não foram observadas alterações significativas na concentração de proteínas.
- As proteínas de alta abundância do soro de leite têm sua concentração diminuída em função da severidade da IIM (alta CCS);
- Proteínas de defesa, como Lactoferrina, Lactoperoxidase e IgG e IgM têm aumento numérico visual em suas concentrações quando se comparam amostras de leite de vacas com mastite subclínica (alta CCS) e amostras de leite de vacas sadias.
- As proteínas Lactoferrina e IgG constituem alvos em potencial para identificar vacas com mastite subclínica a partir de amostras de leite, podendo ser consideradas biomarcadores.

REFERÊNCIAS

1. Hogarth CJ, Fitzpatrick JL, Nolan AM, Young FJ, Pitt A, Eckersall PD. Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics*. 2004 (7):2094-100.
2. Zhao, X, Lacasse, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 2008; 86: 57–65.
3. Zhang GW, Song-Jia L, Yoshimura Y, Isobe N. Expression of cathelicidins mRNA in the goat mammary gland and effect of the intramammary infusion of lipopolysaccharide on milk cathelicidin-2 concentration. *Vet Microbiol.* 2014; 170 (1-2): 125-34.
4. Thomas F C, Mullen W, Tassi R, Ramírez-Torres A, Mudaliar M, McNeilly T N, Zadoks R N, Burchmore R, David Eckersall P. Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* astitis: 1. High abundance proteins, acute phase proteins and peptidomics. *Mol Biosyst.* 2016; 12 (9): 2735-47.
5. Akerstedt M, Forsbäck L, Larsen T, Svennersten-Sjaunja K. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res*, 2011; 78 (1): 88-96.
6. Alonso-Fauste I, Andrés M, Iturralde M, Lampreave F, Gallart J, Álava MA. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J Proteomics*, 2012; 75 (10): 3015-3030.
7. Keefe G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012; 28 (2): 203-216.
8. Wellnitz O, Bruckmaier RM. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal*, 2012; 192 (2): 148-152.
9. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004; 35 (2): 163-87.
10. Grounlund U, Sandgren CH, Waller KP. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic subclinical mastitis. *Vet Res.* 2005; 36: 191- 7
11. Smolenski GA, Wieliczko RJ, Pryor SM, Broadhurst MK, Wheeler TT, Haigh BJ. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143 (1-2): 125-30
12. Green M J, Green L E, Schukken Y H, Bradley A J, Peeler E J, Barkema H W, de Haas Y, Collis V J, Medley G F. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 1256-64
13. Cheng J B, Wang J Q, Bu D P, Liu G L, Zhang C G, Wei H Y, Zhou L Y, Wang J Z. Factors affecting the lactoferrina concentration in bovine milk. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 970-6.

14. Król J, Brodziak A, Litwińczuk Z, Litwińczuk A. Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Pol J Vet Sci.* 2013; 16 (2): 395-7.
15. Rodha AD, Pantoja JC. Using mastitis records and somatic cell count data. *The Vet Clin North Am Food Anim Pract,* 2012; 28 (2): 347-361.
16. Musayeva K, Sederevičius A, Želvytė R, Monkevičienė I, Beliavska-Aleksiejūnė D, Kerzienė S. Concentration of lactoferrina and immunoglobulin G in cows' milk in relation to health status of the udder, lactation and season. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19 (4): 737-44.
17. Harmon RJ. Symposium: Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count—physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci,* 1994; 77 (7): 2103–12.
18. Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci,* 1997; 80 (80): 1833–40.
19. Bislev SL, Deutsch EW, Sun Z, Farrah T, Aebersold R, Moritz RL, Bendixen E, Codrea MC. A bovine peptide atlas of milk and mammary gland proteomes. *Proteomics.* 2012; 12 (18): 2895-9.
20. Smolenski G, Haines S, Kwan FYS, Bond J, Farr V, Davis SR, Stelwagen K, Wheeler TT. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *J Proteome Res,* 2007; 6 (1): 207-15
21. Wheeler TT, Smolenski GA, Harris DP, Gupta SK, Haigh BJ, Broadhurst MK, Molenaar AJ, Stelwagen K. Host-defense-related proteins in cow's milk. *Animal Cons,* 2012; 6 (3): 415-22.
22. Kawai K, Korematsu K, Akiyama K, Okita M, Yoshimura Y, Isobe N. Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrina concentrations and Lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. *Anim Sci J.* 2015; 86 (2): 153-8.
23. Hisaeda K, Koshiishi T, Watanabe M, Miyake H, Yoshimura Y, Isobe N. Change in viable bacterial count during preservation of milk derived from dairy cows with subclinical mastitis and its relationship with antimicrobial components in milk. *J Vet Med Sci.* 2016; 78 (8): 1245-50.
24. Reinhardt TA, Lippolis JD, Nonnecke BJ, Sacco RE. Bovine milk exosome proteome. *J Proteomics.* 2012; 75 (5): 1486-92.
25. Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, Lippolis JD. Bovine milk proteome: Quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics,* 2013; 26 (82): 141-54.
26. Boehmer JL. Proteomic analyses of host and pathogens responses during bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasias.* 2011; 16: 323-38.

27. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L. Farm animal milk proteomics. *J Proteomics*, 2012; 75 (14): 4259-74.
28. Li X, Ding XZ, Wan YL, Liu YM, Du GZ. Comparative proteomic changes of differentially expressed whey proteins in clinical mastitis and healthy yak cows. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):6593-601.
29. Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 2003; 34 (5): 565–78
30. Pyorala S, Hovinen M, Simojoki H, Fitzpatrick J, Ecksersall PD, Orro T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet Rec*. 2011; 168 (20): 535.
31. Mansor R, Mullen W, Albalat A, Zerefos P, Mischak H, Barrett DC, Biggs A, Eckersall PD. A peptidomic approach to biomarker discovery for bovine mastitis. *J Proteomics*. 2013; 85: 89-98
32. Forsbäck L, Lindmark-Månsson H, Andrén A, Åkerstedt M, Svennersten-Sjaunja K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. *Animal*. 2009; 3 (5): 710–17.
33. Bueno, V. F. F.; Mesquita, A. J.; Soares, N. E.; Liveira, A. N.; Oliveira, J. P.; Neves, R. B.; Mansur, J. R. G.; Thomaz, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, 2005; 35 (4): 848-54.
34. Software R. IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
35. Machado P F, Pereira A R, Sarries G A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev Bra Zootec*. 2000; 29 (6); 1883-6.
36. Ma Y, Ryan C, Barbano D M, Galton D M, Rudan M A, Boor K J. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-life of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci*. 2000; 83: 264-74.
37. Fernandes A M, Oliveira C A F, Lima C G. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. *Int Dairy J*. 2007; 17: 111-5
38. Mazal G, Vianna PC, Santos MV, Gigante ML. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. *J Dairy Sci*. 2007;90 (2): 630-6.
39. Gigante M I, Costa M R. Influência das células somáticas nas propriedades tecnológicas do leite e derivados. In: Barbosa SBP, Batista AMV, Monardes H. III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Recife: CCS Gráfica e Editora. 2008; 1: 161-74.
40. Zhang L, Boeren S, van Hooijdonk A C, Vervoort J M, Hettinga K A. A proteomic perspective on the changes in milk proteins due to high somatic cell count. *J Dairy Sci*. 2015; 98 (8): 5339-51.

41. Majewski T. The level of certain milk components in acute mastitis. *Pol Arch Weter.* 1986; 25(1): 9-15.
42. Costa F F, Brito M A V P, Furtado M A M, Martins M F, Oliveira M A L, Barra P M C, Garrido L A, Santos A S O. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. *Anal Methods.* 2014; 6: 1666-73
43. Anema S. G. The use of "Lab-on-a-chip" microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *Int Dairy J.* 2009; 19: 198– 204.
44. Santos A S O, Meurer V M, Jesus D C, Pinto I S B, Egito A S, Furtado M A M, Martins M F. Uso da tecnologia de eletroforese microfluídica "lab-on-a-chip" para análises das proteínas do leite em fraudes de leite caprino com leite bovino. *Vet. e Zootec.* 2013; 20 (2 Supl 1): 86-7
45. Meurer V M. Estudo comparativo entre as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida ureia-page e lab-on-a-chip para detecção de fraude do leite de cabra pela adição de leite bovino. [Dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia; 2014. [acesso em 23 fev 2017]. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1862>
46. Sola M C. Características do leite e sanidade da glândula mamária de bovinos curraleiro pé-duro e pantaneiro. [Tese].Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2015. [acesso em 23 fev 2017]. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/5167/5/Tese%20-%20Mar%C3%ADlia%20Cristina%20Sola%20-%202015.pdf>.
47. Che HX, Tian B, Bai LN, Cheng LM, Liu LL , Zhang XN, Jiang ZM, Xu XX. Development of a test strip for rapid detection of Lactoperoxidase in raw milk. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015 Aug; 16(8):672-9.
48. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients.* 2011; 3 (4): 442-74.
49. Addis MF, Pisanu S, Marogna G, Cubeddu T, Pagnozzi D, Cacciotto C, Campesi F, Schianchi G, Rocca S, Uzzau S. Production and release of antimicrobial and immune defense proteins by mammary epithelial cells following *Streptococcus uberis* infection of sheep. *Infet Immun.* 2013; 81 (9): 3182-97.
50. Guerrero A, Dallas D C, Contreras S, Bhandari A, Cánovas A, Islas-Trejo A, Medrano JF, Parker E A, Wang M, Hettinga K, Chee S, German J B, Barile D, Lebrilla C B. Peptidomic analysis of healthy and subclinically mastitic bovine milk. *Int Dairy J.* 2015 Jul 1;46:46-52.
51. Rocha T L, Brownlow S, Sandler K N, Fothergill-Gilmore L A. New crystal form of β -lactoglobulin. *J. Dairy Res.* 1996; 63: 575-84.
52. Brownlow S, Morais Cabral J H, Cooper R, Flower D R. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure.* 1997; 5: 481-95.

53. Wong C W, Seow HF, Husband A J, Regester G O, Watson D L. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997 May; 56 (1-2): 85-96.
54. Sadek K, Saleh E, Ayoub M. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod.* 2017; 49 (2): 431-7.
55. Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Veterinari Medicina.* 2014; 59 (4): 163–80.
56. Pyörälä S. New strategies to prevent mastitis. *Reprod Domest Anim.* 2002; 37 (4): 211-6.
57. Koskinen, M. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci,* 2009; 92: 952-959.
58. Huang J, Wang H, Wang C, Li J, Li Q, Hou M, Zhong J. Single nucleotide polymorphisms, haplotypes and combined genotypes of lactoferrina gene and their associations with mastitis in Chinese Holstein cattle. *Mol Biol Rep.* 2010; 37 (1): 477-83.
59. Zabolewicz T, Barcewicz M, Brym P, Puckowska P, Kamiński S. Association of polymorphism within LTF gene promoter with lactoferrina concentration in milk of Holstein cows. *Pol J Vet Sci.* 2014;17(4):633-41.
60. Chopra A, Gupta ID, Verma A, Chakravarty AK, Vohra V. Lactoferrin gene promoter variants and their association with clinical and subclinical mastitis in indigenous and crossbred cattle. *Pol J Vet Sci.* 2015;18(3):465-71.
61. Smolenski G A, Broadhurst M K, Stelwagen K, Haigh B J, Wheeler T T. Host defence related responses in bovine milk during an experimentally induced *Streptococcus uberis* infection. *Proteome Sci.* 2014;12 (19): 1-14
62. Zbinden C, Stephan R, Johler S, Borel N, Bünter J, Bruckmaier R M, Wellnitz O. The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PLoS One.* 2014; 9 (1): 1-9.
63. Hurley W L, Rejman J J. Bovine lactoferrina in involuting mammary tissue. *Cell Biol Int.* 1993; 17 (3): 283-9.
64. Baveye, S., Elass, E., Mazurier, J., Spik, G., Legrand, D., 1999. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin Chem Lab Med.* 1999; 37: 281–6.
65. Mao Y, Zhu X, Xing S, Zhang M, Zhang H, Wang X, Karrow N, Yang L, Yang Z. Polymorphisms in the promoter region of the bovine lactoferrina gene influence milk somatic cell score and mlk production traits in Chinese Holstein cows. *Res Vet Sci.* 2015; 103:107-12.

66. Pereyra E A, Dallard B E, Calvinho L F. Aspects of the innate immune response to intramammary *Staphylococcus aureus* infections in cattle. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46 (4): 363-75.
67. Campanella L, Martini E, Pintore M, Tomassetti M. Determination of lactoferrina and immunoglobulin g in animal milks by new immunosensors. *Sensors (Basel).* 2009; 9 (3): 2202-21.
68. Harmon R J, Schanbacher F L, Ferguson L C, Smith K L. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect Immun.* 1976; 13: 533-42.
69. Ostensson K, Lun S. Transfer of immunoglobulins through the mammary endothelium and epithelium and in the local lymphnode of cows during the initial response after intramammary challenge with *E. coli* endotoxin. *Acta Vet Scand.* 2008; 50: 1-10.

CAPÍTULO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE O PROTEINOGRAMA DO LEITE DE VACAS E PRESENÇA DE MICRORGANISMOS

RESUMO

A mastite é a enfermidade mais comum em rebanhos leiteiros e sua etiologia é vasta, podendo ser causada por diversos microrganismos. O perfil de proteínas no leite pode alterar de acordo com o *status* sanitário da vaca com os microrganismos patogênicos, sendo que o estudo dessas proteínas pode levar a um melhor entendimento da relação hospedeiro-parasito. Objetivou-se avaliar o proteinograma de amostras de leite de vacas em lactação e correlacionar com a presença ou ausência de microrganismos isolados e identificados de amostras de leite de vacas aparentemente saudáveis, bem como, com a ausência de isolamento e identificação de microrganismos em amostras de leite de vacas que compuseram o universo amostral. Foram coletadas 101 amostras de leite de vacas provenientes de duas propriedades leiteiras localizadas no estado de Goiás, sendo realizadas análises microbiológicas, de contagem de células somáticas e de eletroforese microfluídica *lab –on – a chip*. Os resultados foram avaliados utilizando a estatística descritiva e representações gráficas. Os microrganismos isolados e identificados que apresentaram crescimento nas amostras coletadas foram bactérias coagulase negativas do gênero *Staphylococcus* spp. (SCN), *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp e leveduras. Não há evidência estatística de que a média da concentração das proteínas presentes nas amostras de leite de vacas seja diferente entre os grupos avaliados. Na comparação entre as concentrações de cada proteína expressa em cada grupo de amostras, verificou-se diferença estatística na concentração da proteína α -lactalbumina entre as amostras do grupo de leveduras e amostras sem crescimento bacteriano. Concluiu-se infecções intramamárias causadas por SCN, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Arcanobacterium pyogenes* não provocaram alterações estatisticamente significativa na concentração das proteínas no soro de leite de vacas em lactação; amostras de leite com altas CCS podem apresentar resultado negativo para cultura microbiológica; os SCN apresentaram maior frequência de isolamento em amostras de leite de vacas em lactação, revelando características de oportunistas e saprófitas desse microrganismo; a infecção da glândula mamária causada por leveduras provoca aumento significativo da proteína α -lactoalbumina; são necessários novos estudos que relacionem diferentes agentes patogênicos causadores de mastite e a concentração proteica do leite, a fim de melhorar o entendimento da fisiopatologia da mastite e evidenciar a presença, ou não, de marcadores proteicos específicos para cada microrganismo visando o diagnóstico de mastite.

Palavras-chave: Mastite, Microrganismo, eletroforese microfluídica

Abstract

Mastitis is the most common disease in dairy herds and it may be caused by several microorganisms. The milk protein profile can be altered according to healthy status of the cow and with the pathogenic microorganisms, and the study of these proteins can lead to a better understanding of the host-parasite relationship. The objective was to evaluate the proteinogram of milk samples from lactating cows and to correlate with the presence or absence of isolated and identified microorganisms from milk samples from apparently healthy cows, as well as the absence of isolation and identification of microorganisms in samples of Milk from cows that made up the sample universe. A total of 101 milk samples were collected from cows from two dairy farms located in the state of Goiás. Microbiological analyzes, somatic cell counts and microfluidic electrophoresis of the lab-on-chip were performed. The results were evaluated using descriptive statistics and graphical representations. The isolated and identified microorganisms that showed growth in the collected samples were *Staphylococcus* spp. Negative Coagulase, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp and yeast. There is no statistical evidence that the mean concentration of the proteins present in cow milk samples is different between the groups evaluated. In the comparison between the concentrations of each expressed protein in each group of samples, a statistical difference was observed in the α -lactalbumin protein concentration between samples from the yeast group and samples without bacterial growth. Intramammary infections caused by SCN, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. And *Arcanobacterium pyogenes* did not cause statistically significant changes in whey protein concentration in lactating cows; Milk samples with high CCS may present negative results for microbiological culture; The SCN presented higher frequency of isolation in milk samples from lactating cows, revealing opportunistic and saprophytic characteristics of this microorganism; Infection of the mammary gland caused by yeast causes a significant increase of α -lactalbumin protein; New studies are needed that relate different mastitis-causing pathogens and milk protein concentration in order to improve understanding of the pathophysiology of mastitis and to evidence the presence or absence of specific protein markers for each micro-organism for the diagnosis of mastitis.

Key-words: Mastitis, microorganisms, microfluidic eletrophoresis

1. INTRODUÇÃO

A mastite é considerada a enfermidade mais comum em rebanhos leiteiros, com relevantes impactos econômicos negativos em toda cadeia produtiva ¹⁻⁷. De acordo com a EMBRAPA ⁸, os gastos relacionados à sanidade do rebanho leiteiro e à qualidade do leite foram estimados em 36% do total dos custos da produção e estão relacionados à redução da produção e qualidade do leite, aumento do volume descartado, aumento da ocorrência de doenças concomitantes, além de maiores custos veterinários (diagnósticos e farmacológicos) e aumento da taxa de reposição animal ^{4, 5, 9, 10}.

A etiopatogenia da mastite em bovinos é baseada em três fatores principais: a exposição ao microrganismo, mecanismos de defesa do organismo e condições do ambiente ^{3, 6}. Usualmente, a mastite ocorre em resposta a uma infecção bacteriana intra-mamária, mas pode também ocorrer por infecções fúngicas e de algas. Traumas mecânicos, térmicos ou produtos químicos também predisõem à ocorrência de Inflamações Intramamárias (IIMs) ¹¹.

A etiologia da mastite bovina é vasta, e uma grande variedade de agentes infecciosos foram associados à essa enfermidade. Comumente é dividida de acordo com a forma de infecção, em contagiosa e ambiental, podendo ainda ser considerada oportunista. Os principais microrganismos causadores de mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis*, os quais são disseminados entre quartos mamários infectados e diretamente para outras vacas durante a ordenha ¹²⁻¹⁶.

A mastite oportunista é causada por bactérias coagulase negativas do gênero *Staphylococcus* spp., considerados saprófitos e geralmente são encontrados na pele dos tetos. Os patógenos relacionados à mastite ambiental são *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli*, além de outros microrganismos do grupo coliformes e membros do gênero *Enterobacter*. As bactérias alcançam o teto do animal a partir do ambiente, principalmente nos períodos entre as ordenhas ¹²⁻¹⁶.

As infecções fúngicas também são consideradas oportunistas e se estabelecem quando os mecanismos de imunidade inata estão reduzidos no organismo da vaca ¹⁰. As principais espécies associadas são *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. A contaminação ambiental é a principal fonte de infecção da glândula mamária, sendo transmitida por ordenhadeiras mecânicas, mãos do ordenhador e outros materiais, sobretudo, quando se observa higiene inadequada. Lesões nos tetos também podem predispor a ocorrência da infecção ^{7, 10}.

Outra classificação da mastite baseia-se na forma de apresentação, em clínica e subclínica. A primeira forma apresenta sinais sistêmicos de infecção e sinais clínicos locais, como inchaço, aumento de temperatura, rigidez e dor na glândula mamária, além de alterações na composição e aparência do leite secretado, como a presença de grumos e pus^{7, 17-21}. Já na forma subclínica não são observadas alterações macroscópicas no leite ejetado, mas sim alterações em sua composição do leite, aumento da contagem de células somáticas (CCS) e redução na quantidade de leite produzido^{7, 17, 18, 21}.

Para que o controle de mastite no rebanho seja bem-sucedido é necessário o diagnóstico rápido e eficiente das vacas com a enfermidade. A detecção da mastite clínica pela inspeção visual, palpação e observação das características do leite secretado é relativamente fácil e rotineira. No entanto, é importante que a mastite subclínica também seja identificada. Por não apresentar sinais clínicos locais ou alteração nas características morfológicas do leite, vacas com mastite subclínica podem não ser corretamente diagnosticadas e permanecerem sem tratamento^{1, 20, 22}, contribuindo com o aumento da CCS no leite produzido e a diminuição da produção de leite no rebanho^{1, 22, 23}.

Um dos primeiros passos para a implantação de um programa de controle de mastite consiste na determinação das frequências das IIMs clínica e subclínica^{20, 24}. Informações sobre a prevalência e distribuição das bactérias contagiosas e ambientais junto com a identificação dos fatores de risco são decisivas no controle e prevenção da doença^{3, 6, 16, 25}. Complementam o programa de controle de mastites, a realização de análises microbiológicas, uma vez que possibilitam o isolamento e a identificação do agente etiológico^{20, 24}.

Tradicionalmente, a análise de CCS e a cultura bacteriana são métodos de referência para detectar vacas com mastites subclínicas, mas a identificação de novos marcadores pode auxiliar no diagnóstico dessa enfermidade em diferentes estágios e por diferentes agentes etiológicos^{26, 27}.

O perfil de proteínas do soro no leite pode alterar de acordo com o *status* sanitário da glândula mamária da vaca e com os microrganismos patogênicos presentes, sendo que o estudo dessas proteínas pode levar a um melhor entendimento da relação hospedeiro-agente. Isto posto, objetivou-se avaliar o proteinograma de amostras de leite de vacas em lactação e correlacionar com a presença ou ausência de microrganismos isolados e identificados de amostras de leite de vacas aparentemente saudáveis, bem como, com a ausência de isolamento e identificação de microrganismos em amostras de leite de vacas que compuseram o universo amostral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção das propriedades

Para o presente estudo foram selecionadas duas propriedades tendo como base o número de animais em lactação, as benfeitorias existentes e a facilidade de acesso. Uma das propriedades encontra-se localizada no município de Goiânia e a outra no município de Goiás. As vacas utilizadas neste estudo eram principalmente das raças Holandesa e vacas mestiças, com média de 5 anos de idade e 19 litros de produção média diária. A coleta das amostras foi realizada em vacas aparentemente saudáveis que não apresentavam sinais clínicos de doenças, como a mastite. As duas propriedades possuíam sistema de ordenha mecânica provido de medidor e tanque de refrigeração para armazenamento do leite ordenhado.

A propriedade localizada no município de Goiânia possuía 52 vacas em lactação e realizava duas ordenhas por dia em equipamento circuito fechado. São animais mestiços oriundos do cruzamento entre as raças Jersey e Holandesa. As vacas possuíam idade média de 5 anos e produção média de 17 litros.

A propriedade localizada no município de Goiás possuía 181 vacas em lactação, todas da raça Holandesa, com média de idade de 5 anos e produção média de 23 litros. Destas 181 vacas, 52 eram ordenhadas três vezes ao dia, e 129 eram ordenhadas duas vezes ao dia. Para o presente estudo, foram coletadas amostras de leite das 52 vacas que eram ordenhadas três vezes ao dia. A coleta de amostras de apenas uma ordenha pode ser realizada quando os intervalos entre as ordenhas são iguais. No presente estudo, foram coletadas amostras das 52 vacas, na ordenha do meio do dia, visto que o intervalo entre as ordenhas era de 8 horas.

2.2. Amostras de leite dos quartos mamários

A coleta de amostras para análise microbiológica foi realizada em conformidade com as recomendações do *National Mastitis Council* (NMC) ²⁸. No momento da ordenha, após a realização do procedimento de *pré-dipping* e da ordenha dos primeiros jatos em caneca de fundo preto, alíquotas de leite foram coletadas e armazenadas em frascos esterilizados. As amostras compostas por leite dos quartos mamários de cada vaca foram coletadas perfazendo um volume de aproximadamente 10 mL. A fim de simular a rotina da ordenha, não foi utilizado o álcool 70% para assepsia dos tetos como preconiza o NMC ²⁸.

Para a análise de proteinograma do leite e CCS, amostras individuais de cada vaca foram representativas de uma ordenha completa de cada animal, em um período de 24 horas. A coleta do leite em ordenhadeira mecânica de circuito fechado foi realizada com o auxílio de

medidores, visando o preenchimento dos frascos. Após a ordenha completa, foi realizada a agitação do leite e o volume de 40 mL vertido nos frascos de coleta. A coleta foi realizada em duplicata, sendo que um dos frascos continha uma pastilha de Bronopol® (D&F Control Systems, Dublin) para a conservação do leite visando a análise de CCS, e outra não continha conservante e destinava-se a análise de proteínas.

Todas as amostras foram identificadas (animal, data) e acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável. As amostras colhidas para análises de Proteinograma e microbiológicas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos Multiusuário do Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA/EVZ/UFG), para armazenamento e posterior realização de análises. As amostras colhidas para análise de CCS foram encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite do CPA/EVZ/UFG.

2.3. Análise microbiológica

O processamento das amostras, bem como o isolamento e a identificação dos microrganismos causadores de mastite, foi realizado de acordo com o NMC ²⁸. Foram inoculados 10µL das amostras de leite em placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% e incubadas a temperatura de 37°C por um período de 48 horas. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFCs) que apresentaram crescimento foram submetidas à coloração de Gram, análise de perfil de hemólise e morfologia. Após o teste de Coloração de Gram, foram realizados testes bioquímicos para diferenciar gêneros e espécies (Figura 1).

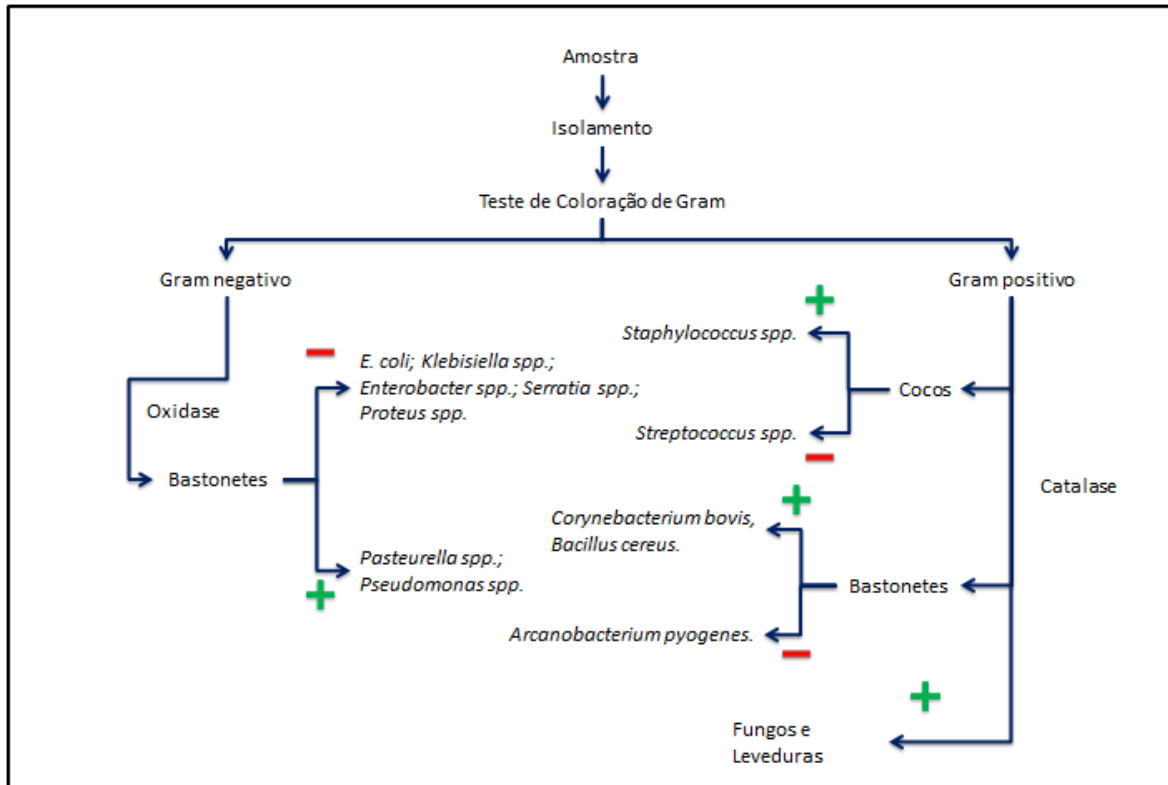


Figura 1: Etapas/Esquema da análise microbiológica realizada

Fonte: Adaptado de *National Mastitis Council* (1987)

2.4. Contagem de Células Somáticas

As análises de CCS foram realizadas no LQL/CPA/EVZ/UFG em equipamento Fossomatic 500 Basic® (FOSS ELECTRIC A/S, HILLEROD, DENMARK, 2000), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo, sendo o resultado expresso em células/mL 24.

2.5. Análise do proteinograma do leite

Após a coleta, as amostras de leite cru foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos Multiusuário do CPA/EVZ/UFG, onde passaram por uma etapa de centrifugação a 1.200 xg para separação e retirada da gordura e, em seguida, foram congeladas e armazenadas em congeladores à temperatura de -80°C para posterior realização da análise de Proteinograma.

A análise de separação das proteínas, denominada de Proteinograma, foi realizada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) utilizando o Agilent Protein Kit 230, o qual é capaz de identificar e quantificar proteínas com peso molecular entre 14 e 230 kDa. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário

de Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O princípio analítico do ensaio utilizado para a separação das proteínas das amostras de leite foi a eletroforese microfluídica em *microchip (lab-on-a-chip)*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

A eficiência da análise foi verificada a partir do resultado da corrida eletroforética do *Ladder* (marcador de peso molecular) (Figura 2). O resultado da análise do *ladder* deve apresentar dois picos de menor e maior peso molecular (*Lower Marker* e *Upper Marker*, respectivamente); outros sete picos, a base do eletroferograma deve ser limpa, lisa e sem ruídos, e cada pico deve ter pelo menos 20 unidades de fluorescência (FU) maior que o registrado na base.

As análises de eletroforese microfluídica tiveram padrões conhecidos por meio da corrida de proteínas purificadas: albumina (ALB), α -lactalbumina bovina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), lactoferrina (LF) e imunoglobulina G (IgG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (Figura 3).

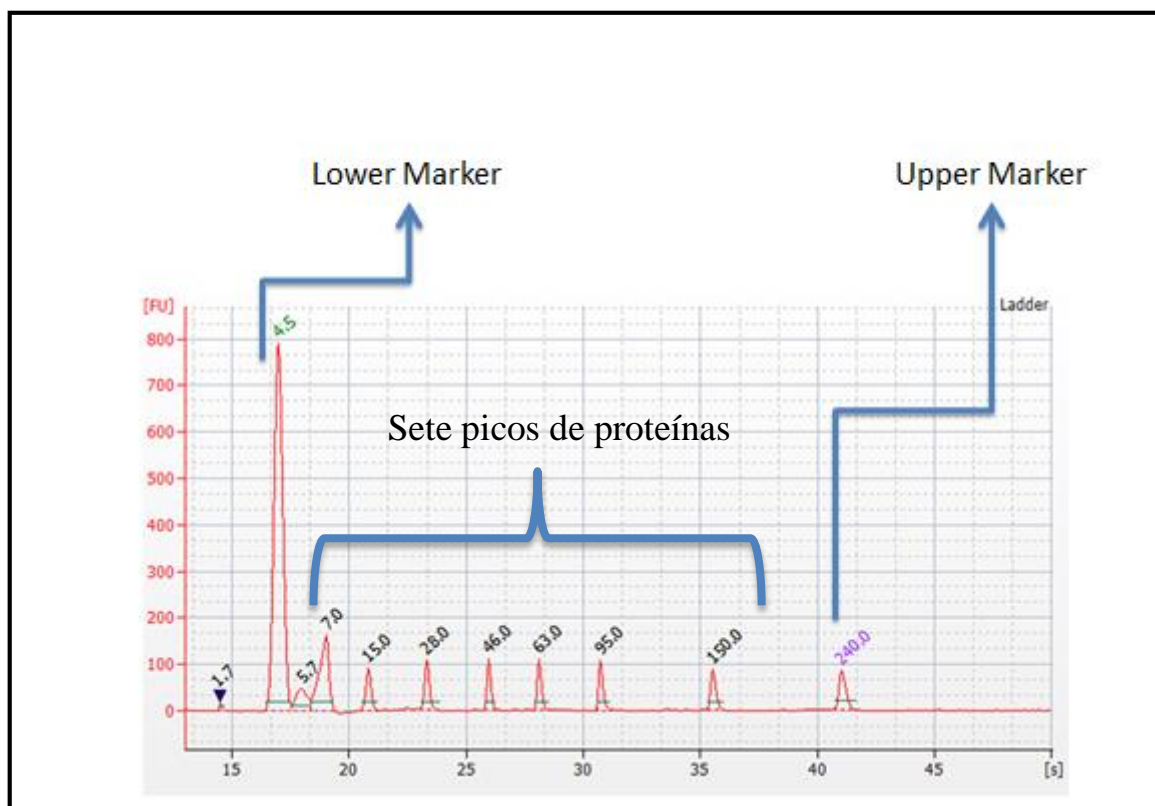


FIGURA 2: Eletroferograma do marcador de peso molecular *Ladder*

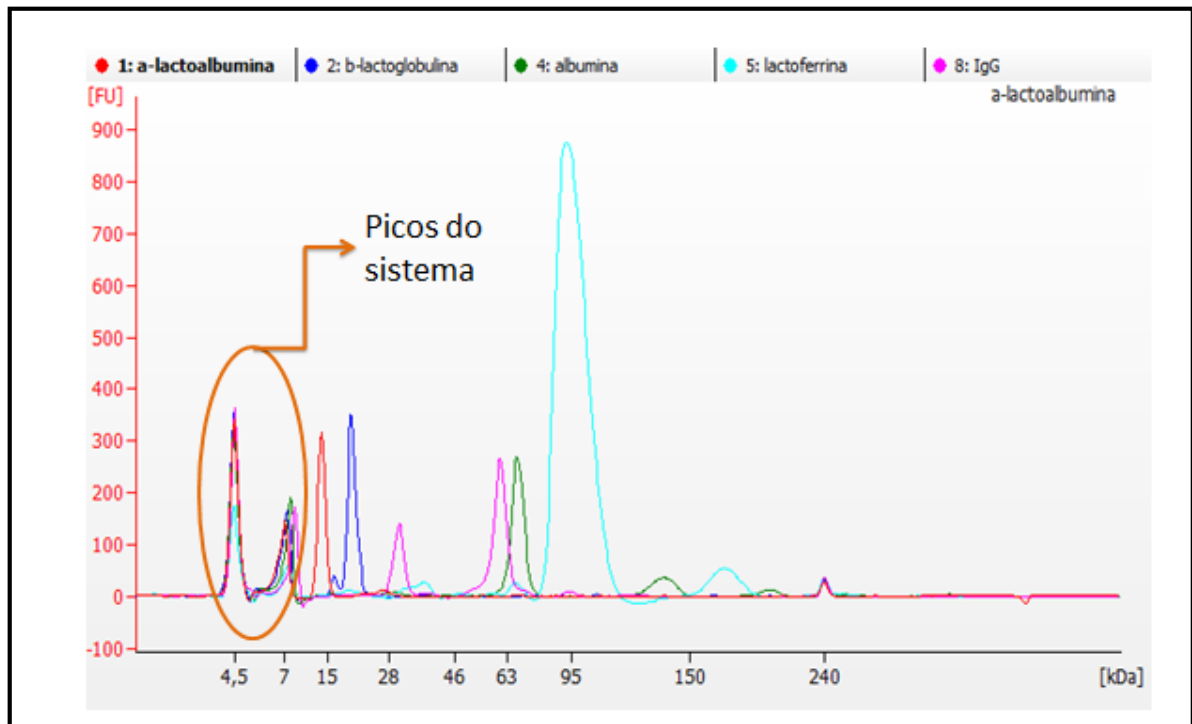


Figura 3: Representação gráfica dos picos de proteínas purificadas (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina, lactoferrina e IgG) e respectivo pelo molecular (kDa).

A partir dos resultados da eletroforese microfluídica e da avaliação dos eletroferogramas foi possível identificar e denominar as proteínas do soro do leite obtidas nos eletroferogramas de acordo com o peso molecular expresso. Os picos de proteínas identificados nas amostras foram comparados com resultados de análise de eletroforese microfluídica de padrões de proteínas purificada e com padrões de proteínas identificadas da literatura (Quadro 1).

Quadro 1: Proteínas do soro e peso molecular correspondente

| Proteína | Padrão de Peso Molecular |
|--|--------------------------|
| α - lactalbumina (α -LA) | 14 kDa* |
| β -lactoglobulina Pico 1 (β -LG pico 1) | 16,5 kDa* |
| β -lactoglobulina Pico 2 (β -LG pico 1) | 19,9 kDa* |
| IgG cadeia leve | 30,8 kDa* |
| IgG cadeia pesada | 60,8 kDa* |
| IgM | 70kDa*** |
| Albumina (ALB) | 67,8 kDa* |
| Lactoperoxidase (LPO) | 80kDa** |
| Lactoferrina (LF) | 93 kDa* |

Fonte: *Padrões de peso molecular informado pelas proteínas purificadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); ** Che et al. ⁶⁷; *** Hurley e Theil ⁶⁸.

2.6. Análise Estatística

Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso com oito tratamentos, no qual cada grupo de microrganismo foi considerado um tratamento. Os dados foram analisados utilizando a estatística descritiva e representações gráficas. A análise de variância (ANOVA) com um fator fixo foi utilizada para avaliar as modificações das proteínas do soro de leite em relação ao Escore de Células Somáticas, seguida do teste *post-hoc* Mann-Whitney U (comparação 2 a 2) para a identificação das diferenças específicas nas variáveis em questão, seguindo o critério de significância estatística estabelecido ($p < 0,05$).

Os programas utilizados para a realização das análises estatísticas foram SPSS-version 19.0 e software R ²⁹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise microbiológica das amostras de leite de vacas

Foram coletadas 104 amostras e analisadas microbiologicamente um total de 101 amostras de leite de vacas, sendo que, 29 não apresentaram crescimento microbiano. Os microrganismos isolados e identificados foram bactérias coagulase negativas do gênero *Staphylococcus* spp. (SCN); *Corynebacterium* spp.; *Arcanobacterium pyogenes*; *Streptococcus* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus* spp. e leveduras. Quatro amostras foram coletadas de vacas em tratamento com antibiótico (ATB) e não apresentaram crescimento bacteriano (Figura 4).

Do total das amostras coletadas de leite de vacas, 54 (53%) indicavam presença de mastite subclínica com CCS maior que 200.000 cel/mL. O restante das amostras (47%) apresentou CCS menor que 200.000 cel/mL, sendo que o menor valor obtido foi 15.000 cel/mL e o maior valor 4.234.000 cel/mL. Devido à importância da enfermidade e de seu diagnóstico, a frequência da mastite subclínica vem sendo discutida em diferentes países. Estudo realizado em rebanhos leiteiros da Polônia foi observada uma taxa de prevalência de mastite subclínica de, aproximadamente, 36,7% ²¹.

No tocante, a frequência de mastite bovina ao redor no mundo, a literatura cita 56% de infecção intramamárias no Quênia ³⁰, 31% na Finlândia ³¹, 86,2% na Uganda ³², 85,33% na Nigéria ³³, 46% na Índia ³⁴, 64,3% na Etiópia ³⁵, 26,3% no Canadá ³⁶. No Uruguai, a frequência de mastite subclínica observada foi 52,4% ³⁷. Nos Estados Unidos da América, entre 10 e 20% das propriedades leiteiras possuem média de CCS de amostras de leite de tanque de refrigeração maior que o limite máximo permitido, 400.000 cel/mL, o que indica que mais de 80% das fazendas leiteiras americanas possuem um controle de mastite de rebanho ineficiente ³⁸.

Estudos de prevalência de mastite subclínica em rebanhos brasileiros reportaram percentual de 15,6% ³⁹; 65% ²⁰; 41,10% ³⁹; 15,4% ⁴¹. Portanto, o percentual encontrado no presente estudo, 53%, encontra-se dentro da amplitude de variação citada na literatura, ou seja, 15,4% a 65%.

No presente estudo, 25% (29/101) das amostras de leite de vacas não apresentaram crescimento microbiano, e destas, 12 (41%) apresentaram resultado de CCS superior a 200.000 cel/mL, indicando a ocorrência de mastite subclínica. Apesar da cultura bacteriana ser o método de referência para a identificação de microrganismos causadores de mastite, a técnica possui algumas limitações, como nos casos nos quais o crescimento

bacteriano não ocorre. Isso pode ser devido a várias causas, entre elas: baixa concentração do patógeno na amostra de leite, eliminação espontânea da infecção pela glândula mamária, localização intracelular de determinados patógenos e substâncias endógenas inibitórias que estão presentes no leite que diminuem a viabilidade do crescimento bacteriano, dentre elas a Lactoferrina (LF), Lactoperoxidase (LPO), entre outras, tais como o ambiente de incubação, a seletividade e disponibilidade de nutrientes no meio de cultura ^{17, 39}

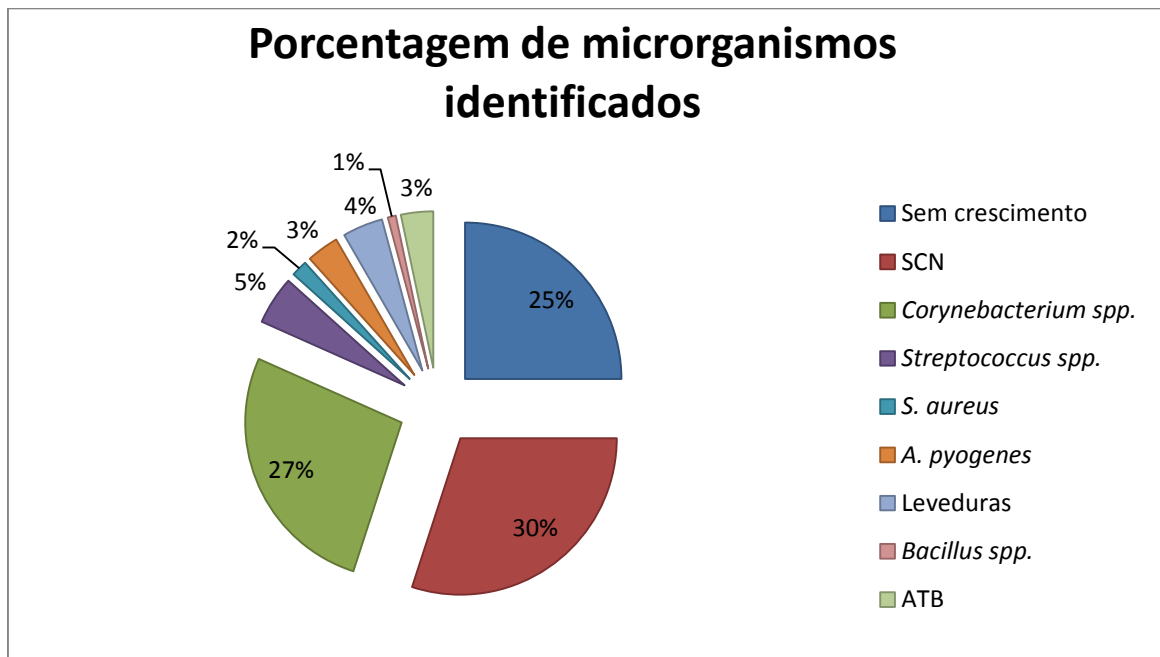


Figura 4: Representação gráfica da identificação dos microrganismos isolados das amostras de leite de vacas em lactação coletadas.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos, nos quais em torno de 30% das amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica ou subclínica, quando analisadas pelo método de bacteriologia convencional, não apresentaram crescimento bacteriano ^{39, 41, 42, 43}.

Os microrganismos isolados com maior frequência no presente estudo foram do grupo SCN, presentes em um terço das amostras de leite. Outros microrganismos, em ordem crescente de frequência de ocorrência, foram *Corynebacterium spp.*; *Streptococcus spp.*; Leveduras; *A. pyogenes*, *S. aureus* e *Bacillus spp.* Outros estudos também observaram maior frequência de isolamento por microrganismos do grupo SCN em amostras de leite de vacas. Assim, Sztachañska et al. (2016) observaram que 31,6% dos animais apresentavam mastite subclínica causada por SCN, seguido por *Streptococcus spp.* (15,6%); *S. aureus* (12,1%) e

fungos (12,2%). Busato et al. ⁴⁴, Piepers et al ⁴⁵ e Levison et al. ⁴⁶ também relataram o SCN como principal microrganismo isolado de amostras de leite de vacas. No estudo de Busato et al. ⁴⁴, realizado com amostras de leite de vacas provenientes de propriedades leiteiras da Suíça, 51% dos isolados de microrganismos de amostras de leite por microbiologia convencional eram SCN, seguido de *Corynebacterium bovis* (35%), *Streptococcus* spp. (17,5%), *S. aureus* (12%), *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* (menor que 1%).

De acordo com Saab et al. ⁴¹ em 32,9% das amostras de leite de vacas da região de Nova Tebas, Paraná, foi possível isolar microrganismos do grupo SCN, seguido de *Streptococcus* spp., *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase positivo, bacilo Gram negativo, *Corynebacterium* spp. e *Candida* spp.

A maior prevalência dos microrganismos do grupo SCN pode ser explicada, em partes, por suas características ambiental, saprófita e oportunista ^{16, 39}, ou seja, são microrganismos que estão presentes tanto no ambiente dos animais quanto na pele dos tetos e úberes das vacas, causando a enfermidade em conjunto com outros microrganismos. No presente trabalho, oito amostras de leite apresentaram crescimento para o grupo SCN concomitantemente com outros microrganismos.

As bactérias do grupo SCN são consideradas mais comumente associadas à IIMs, denominadas frequentemente como “patógenos menores” ⁴⁷⁻⁵⁰. No entanto, a relevância clínica deste grupo é controversa ⁵⁰⁻⁵², pois são associados tanto a casos de mastites subclínicas e clínicas de intensidade leve, quanto a casos crônicos de mastites, com relatos de produção de fatores de virulência e aumento da CCS ^{13, 39, 50, 53-55}.

Em estudo realizado com amostras de leite coletadas de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras, De Visscher et al. ⁵⁶ puderam observar que o grupo SCN é altamente prevalente, podendo ser originário do ambiente da vaca e da pele do teto e do úbere. Alguns autores afirmam que maior prevalência deste grupo de microrganismo em amostras de leite de vacas com mastite subclínica pode estar associada à higiene inadequada nos locais de ordenha e mãos de manipuladores e à contaminação ambiental ^{2, 39}.

No presente estudo, as amostras de leite de vacas que revelaram presença do grupo SCN apresentaram diferentes resultados para CCS, sendo que o menor valor encontrado foi 26.000 cel/mL e o maior 3.274.000 cel/mL. Do total das amostras, 24 (67%) apresentaram CCS maior que 200.000 cel/mL, indicando um quadro de mastite subclínica. A ocorrência de microrganismos do gênero SCN em amostras de leite de vacas com mastite subclínica tem sido relatada em outros estudos, os quais reportam frequências variadas, tais como, 5,74% ⁵⁷;

18,60%⁵⁸; 74,60%⁴⁰; 27%⁵⁹; 32,3%³⁹. Em um estudo realizado com amostras de leite de vacas de rebanhos localizados nos Açores, Portugal, foi observado que 100% das amostras de leite de vacas revelaram a presença do gênero SCN⁶⁰, confirmando a característica de patógeno emergente relatado em outro estudo¹³.

Todas as amostras de leite nas quais estava presente o agente *A. pyogenes* também apresentaram crescimento concomitante com outros microrganismos, como *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. e SCN. Esse fato pode estar relacionado à característica oportunista do microrganismo que pode ser, potencialmente, transferido do ambiente contaminado para a glândula mamária durante a ordenha¹⁶.

A frequência de microrganismos do gênero *Corynebacterium* spp. foi de 27% (32 amostras). Destas, 14 (43,75%) amostras indicavam a ocorrência de mastite subclínica em função do resultado de CCS apresentado (CCS > 200.000 cel/mL). A presença de *Corynebacterium* spp. em amostras de leite de vacas com mastite subclínica tem sido também reportada em outros estudos. Martins et al. (2010), em estudo realizado em Cuiabá (MT); evidenciaram *Corynebacterium* spp. como o principal causador de mastite subclínica em vacas, com frequência de (34,4%). Oliveira et al.³⁹ obtiveram frequência de 4,8%; Barbalho e Mota,⁵⁸ encontraram frequência de 27,91% de *Corynebacterium* spp. isolados de amostras de leite de vacas.

A alta ocorrência observada de *Corynebacterium* spp. pode estar relacionada à ineficiência da etapa de *pós-dipping* durante a ordenha, uma vez que a desinfecção do teto após a ordenha previne a contaminação cruzada dos microrganismos patogênicos contagiosos entre vacas durante a ordenha^{20,61}.

A frequência de isolamento de *Streptococcus* spp. foi de 5% nas amostras de leite e, deste percentual, metade (50%) foram provenientes de vacas com mastite subclínica, com média de CCS de 291.000 cel/mL. Barbalho e Mota⁵⁸ reportaram frequência de *Streptococcus* spp em amostras de leite de 4,65%. Por sua vez, Oliveira et al.³⁹ relataram uma frequência de 4,8% de crescimento de *Streptococcus* spp. em amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica. Esses resultados corroboram os encontrados no presente estudo.

Outro dado relevante obtido neste estudo foi a presença de leveduras em amostras de leite de vacas na frequência de 4%. Dentre as amostras, apenas uma não indicava mastite subclínica, as outras três amostras de leite apresentaram resultado médio de CCS de 1.217.000 cel/mL. Um tema emergente em propriedades leiteiras é a mastite causada por leveduras. Diferentes frequências de mastites por leveduras têm sido relatadas, como 9,6%⁶², 7,07%⁶³, e

12,2%²¹. Frequências menores, as quais variam entre 4,5% e 1,25, também foram observadas^{10, 41, 57, 64}. As infecções por leveduras são associadas, principalmente, às condições impróprias do ambiente e práticas inadequadas de higiene de ordenha. Tratamentos prolongados com administração intramamárias de antibióticos também favorece a colonização da glândula mamária por leveduras^{10, 21, 63, 64}.

3.2. Análise descritiva do Proteinograma de acordo com os microrganismos isolados

A análise de eletroforese microfluídica para determinação do Proteinograma foi realizada em 73 amostras de leite de vacas, uma vez que 28 amostras foram consideradas inaptas para a realização do ensaio (Figura 5).

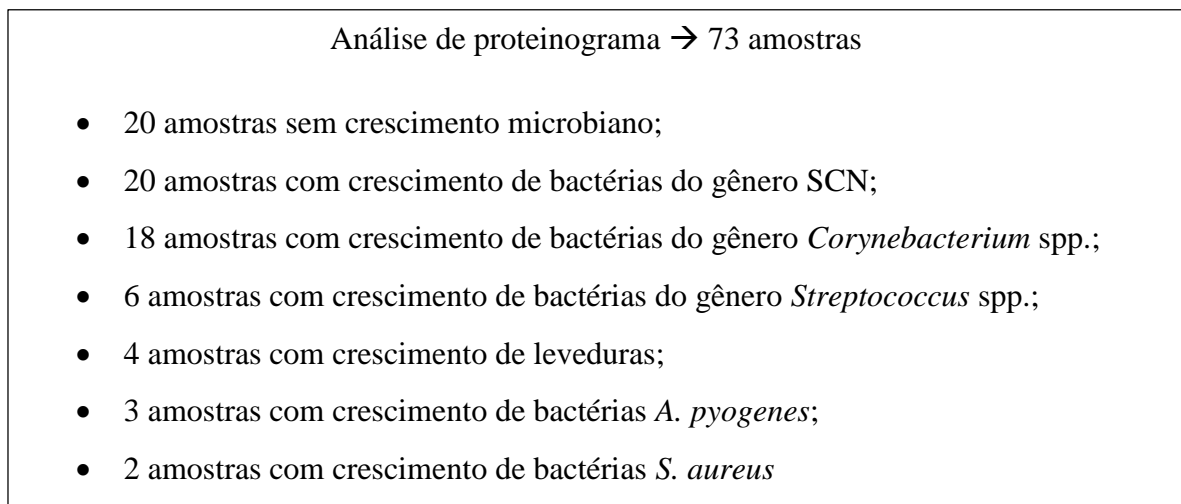


Figura 5 – Representação esquemática do número de amostras de leite de cada grupo de microrganismos utilizadas para análise de proteinograma.

Os resultados do Proteinograma (Figura 6) de cada amostra de leite analisada pela técnica de eletroforese microfluídica foram agrupados de acordo com o microrganismo isolado e identificado. A partir da média do total da concentração das proteínas do soro de leite obtidas em cada amostra, foi possível realizar uma análise descritiva para avaliação da diferença entre a concentração total de proteínas expressas nas amostras de leite de vacas e o microrganismo presente (Tabela 1) (Figura 7).

A análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%, revelou que não há evidência estatística significativa ($p \geq 0,05$) de que a média da concentração das proteínas do soro presentes nas amostras de leite de vacas seja diferente entre os grupos avaliados. No entanto, pode-se observar na Tabela 1 que as amostras de leite de vacas do grupo “sem crescimento” apresentaram média numérica da concentração de proteínas expressas maior que a média da concentração de proteínas das amostras de leite dos outros grupos amostrais. Um fator que pode explicar, em parte, esse resultado é a diminuição da

concentração das proteínas de alta abundância no soro do leite (α -LA e β -LG) na ocorrência de mastites ^{1, 65, 66}.

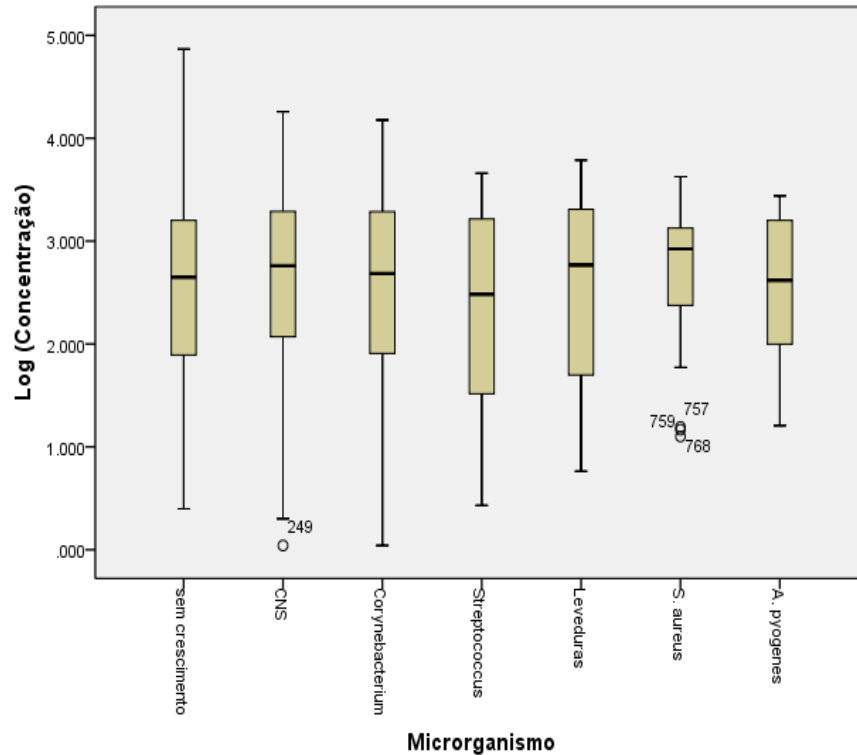


Figura 6: Representação gráfica da concentração total das proteínas expressas de acordo com o grupo de microrganismos presentes nas amostras de leite de vacas. Goiânia – GO, 2017.

Tabela 1: Análise descritiva da diferença de concentração total das proteínas expressas nas amostras por microrganismo identificado, Goiânia-GO, 2017.

| Concentração (ng/ul) | Microrganismo | N* | Média | Desvio-padrão | Log (concentração) | |
|----------------------|------------------------|-----|---------|---------------|--------------------|---------------|
| | | | | | Média | Desvio-padrão |
| | sem crescimento | 224 | 1571,35 | 5408,32 | | |
| | SCN | 219 | 1219,28 | 1815,70 | 2,59 | 0,80 |
| | <i>Corynebacterium</i> | 194 | 1389,35 | 2292,09 | 2,55 | 0,86 |
| | <i>Streptococcus</i> | 62 | 857,40 | 1071,16 | 2,36 | 0,90 |
| | Leveduras | 48 | 1230,45 | 1507,66 | 2,55 | 0,87 |
| | <i>S. aureus</i> | 21 | 1245,59 | 1392,70 | 2,66 | 0,81 |
| | <i>A. pyogenes</i> | 29 | 843,20 | 866,23 | 2,49 | 0,79 |

*N – número de proteínas identificadas.

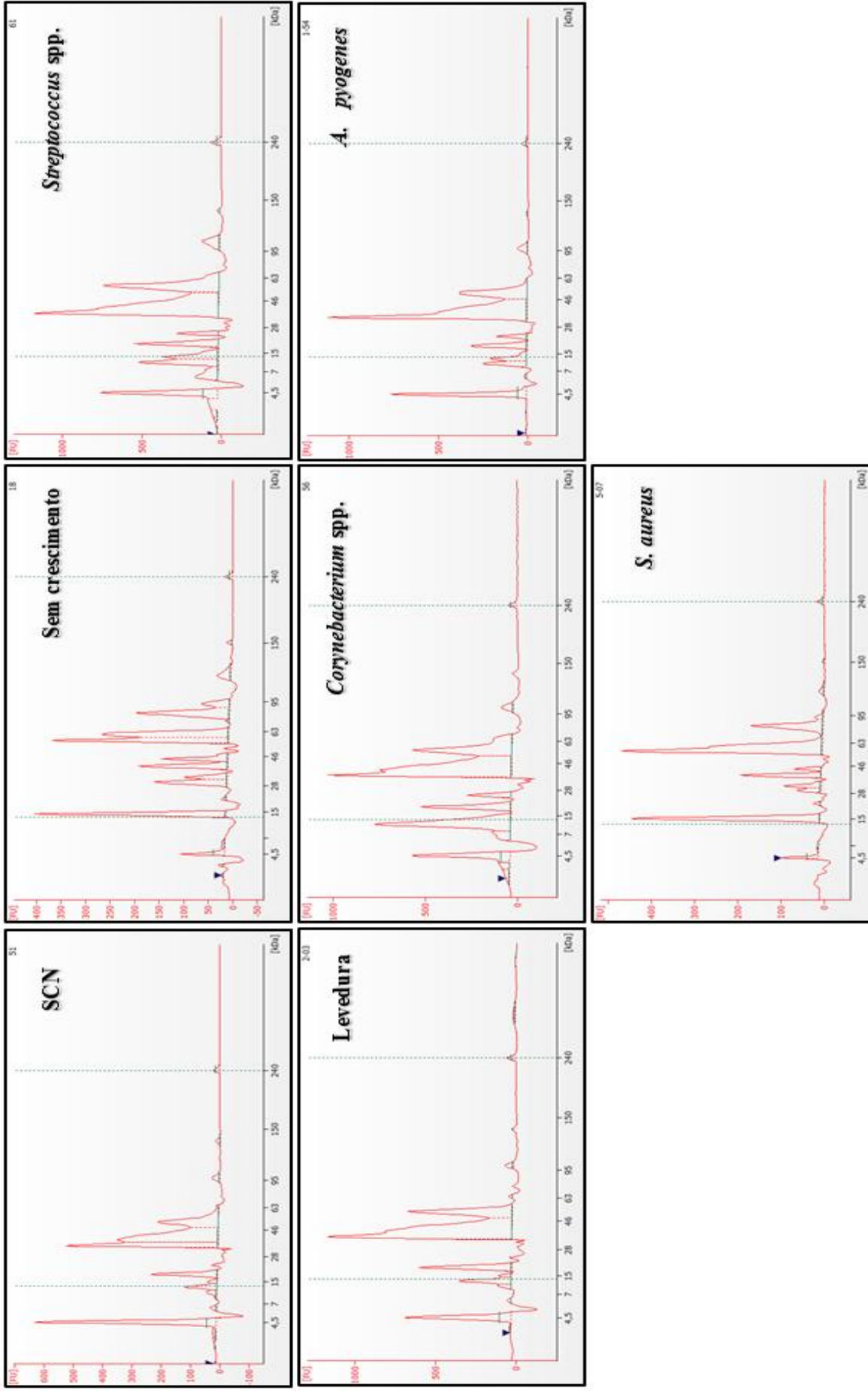


Figura 7: Eletroferogramas de amostras de leite de vacas de acordo com os microrganismos isolados. Sendo Fu: unidade de Fluorescência e kDa: quilo Dalton

A comparação da concentração das proteínas do soro de leite entre as amostras que analisadas pode ser visualizada na Tabela 2. Devido ao baixo número de amostras analisadas para a proteína IgM, não foi possível a realização de testes estatísticos. De igual forma não foi possível comparar a concentração das proteínas identificadas nas amostras de leite contaminadas com *S. aureus*.

Tabela 2: Análise descritiva da variável concentração das proteínas identificadas nas amostras leite de acordo com o resultado da análise microbiológica, Goiânia-GO, 2017.

| Proteína | Variável (ng/uL) | Microrganismo | N* | Média | Desvio-padrão | |
|------------------------|---------------------|------------------------|--------------|-----------------|---------------|--------|
| α -LA | Concentração | sem crescimento | 18 | 1281,22 | 1346,17 | a, ab |
| | | SCN | 16 | 1498,24 | 1593,57 | a, ab |
| | | <i>Corynebacterium</i> | 16 | 1243,84 | 1276,09 | a, ab |
| | | <i>Streptococcus</i> | 4 | 600,15 | 836,98 | a, ab |
| | | Leveduras | 4 | 4395,10 | 1171,22 | b |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 2 | 723,95 | 990,02 | a, ab |
| | | LPO | Concentração | sem crescimento | 10 | 70,41 |
| SCN | 10 | | | 1440,36 | 2898,39 | a |
| <i>Corynebacterium</i> | 12 | | | 425,20 | 1319,90 | a |
| <i>Streptococcus</i> | 6 | | | 32,03 | 36,98 | a |
| Leveduras | 2 | | | 1017,55 | 1386,14 | a |
| <i>A. pyogenes</i> | 2 | | | 25,40 | 11,03 | a |
| LF | Concentração | | | sem crescimento | 20 | 262,46 |
| | | SCN | 18 | 540,69 | 1149,40 | a |
| | | <i>Corynebacterium</i> | 16 | 409,86 | 639,09 | a |
| | | <i>Streptococcus</i> | 6 | 252,63 | 216,50 | a |
| | | Leveduras | 4 | 232,95 | 294,24 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 3 | 386,20 | 232,68 | a |
| | | β -LG pico 1 | Concentração | sem crescimento | 19 | 618,35 |
| SCN | 19 | | | 1234,46 | 907,06 | a |
| <i>Corynebacterium</i> | 18 | | | 1304,11 | 1501,55 | a |
| <i>Streptococcus</i> | 6 | | | 889,65 | 559,31 | a |

| | | | | | | |
|-------------------------|--------------|------------------------|----|---------|---------|---|
| | | Leveduras | 4 | 888,48 | 930,21 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 3 | 1028,40 | 92,43 | a |
| | | sem crescimento | 20 | 688,01 | 946,24 | a |
| | | SCN | 17 | 412,15 | 299,94 | a |
| β-LG pico 2 | Concentração | <i>Corynebacterium</i> | 18 | 454,94 | 546,58 | a |
| | | <i>Streptococcus</i> | 6 | 349,75 | 136,41 | a |
| | | Leveduras | 4 | 402,03 | 337,83 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 3 | 338,00 | 71,23 | a |
| | | sem crescimento | 16 | 2105,38 | 3291,45 | a |
| | | SCN | 15 | 1159,83 | 1017,82 | a |
| ALB | Concentração | <i>Corynebacterium</i> | 14 | 901,96 | 1156,76 | a |
| | | <i>Streptococcus</i> | 4 | 909,58 | 1581,99 | a |
| | | Leveduras | 4 | 1387,50 | 1210,84 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 2 | 117,05 | 137,11 | a |
| | | sem crescimento | 19 | 1854,94 | 1232,41 | a |
| | | SCN | 20 | 2466,93 | 1223,28 | a |
| IgG cadeia pesada | Concentração | <i>Corynebacterium</i> | 17 | 2927,65 | 2642,87 | a |
| | | <i>Streptococcus</i> | 6 | 1617,70 | 859,07 | a |
| | | Leveduras | 4 | 2657,30 | 690,91 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 3 | 1960,50 | 65,58 | a |
| | | sem crescimento | 20 | 2785,63 | 2746,57 | a |
| | | SCN | 20 | 2304,40 | 1408,34 | a |
| IgG cadeia leve | Concentração | <i>Corynebacterium</i> | 18 | 3128,42 | 3469,95 | a |
| | | <i>Streptococcus</i> | 6 | 2160,88 | 1323,03 | a |
| | | Leveduras | 4 | 1941,70 | 1219,42 | a |
| | | <i>A. pyogenes</i> | 3 | 2175,47 | 576,71 | a |

*N – número de proteínas identificadas

Legenda: A diferença estatística entre as médias está representada por letras diferentes. Letras iguais não apresentam diferença estatística (valor $p \geq 0,05$).

Ao avaliar estatisticamente as diferenças entre as concentrações de cada proteína, expressas em cada grupo de amostras, verificou-se que, houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as amostras do grupo de Leveduras e do grupo sem crescimento na concentração da proteína α -LA, que apresento um aumento de três vezes na concentração da proteína α -LA nas

amostras de leite de vacas contaminadas com leveduras quando comparadas com as amostras de leite de vacas sem crescimento microbiano.

Em casos de mastite, a concentração da proteína α -LA no leite tende a diminuir, sendo que, por outro lado, ocorre o aumento de outras proteínas com efeito antimicrobiano e anti-inflamatório ^{1, 66}. O resultado obtido no presente estudo pode indicar uma característica das infecções intramamárias por leveduras. Suspeita-se que essas infecções possam provocar alteração da concentração de proteínas, levando ao aumento da concentração de α -LA, ao contrário do que acontece nas infecções intramamárias bacterianas.

A concentração das proteínas do soro de leite relacionadas à defesa do hospedeiro (LPO, LF, IgG) foram visualmente maiores nas amostras de leite de vacas com isolamento de microrganismos quando comparada com as amostras de leite de vacas sem crescimento de microrganismos. Para a proteína LPO os grupos com maiores concentrações foram SCN, Leveduras e *Corynebacterium* spp. Para a proteína LF, as maiores concentrações ocorreram nas amostras dos grupos SCN, *Corynebacterium* spp. e *A. pyogenes*. As concentrações de proteína IgG foram maiores para os grupos *Corynebacterium* spp.; Leveduras; SCN e *A. pyogenes*. No entanto, esse aumento não foi diferente estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Diversos estudos com amostras de leite oriundos de vacas com mastite apontam a redução na concentração das proteínas maiores do leite e aumento na concentração das proteínas com atividades imunomodulatórias e de defesa do organismo, como a LF, IgG e LPO ^{1, 66}. Estudos prévios sobre o perfil de proteínas do leite de vacas e sua relação com a presença de diferentes microrganismos são escassos. Em geral realizam comparações entre apenas dois tipos diferentes de microrganismos e, até mesmo, entre diferentes cepas de mesma espécie de microrganismos.

Esses estudos têm como objetivo comparar os perfis de proteínas entre amostras de leite de vacas saudáveis e amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, além de comparar com perfis de proteínas de amostras de leite de vacas com infecção por diferentes microrganismos, sendo a maioria deles *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus* spp. ^{19, 66, 69-71}.

No presente estudo, não se observou aumento significativo ($p \geq 0,05$) da concentração das proteínas de defesa nas amostras de leite sem crescimento microbiano. Porém, outros estudos reportaram diferenças na expressão e na concentração de proteínas de defesa presentes em amostras de leite de vacas saudáveis quando comparadas com amostras de leite contaminadas com microrganismos ^{19, 66, 69-72}. Ainda neste estudo, observou-se a diminuição na concentração das proteínas de grande abundância do leite em amostras de leite

de vacas com mastites, como a α -LA e β -LB. Esse resultado é corroborado por Thomas et al.⁶⁶.

A LF é uma proteína presente no leite que auxilia na defesa da glândula mamária, sendo que, durante as infecções, sua concentração pode aumentar significativamente. Possui atividades imunomodulatórias com efeito bacteriostático, sendo capaz de se ligar ao ferro disponível e competir com as bactérias invasoras⁷³. Outro mecanismo de defesa relatado são as interações com a parede celular de bactérias Gram-positivas, como os *Staphylococcus* spp. e os *Streptococcus* spp.⁷³. No presente estudo observou-se predominância de bactérias Gram-positivas, no entanto, apesar de observar um aumento da concentração de LF nas amostras de leite de vacas com presença de microrganismos, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

Neste estudo, não foi possível observar alteração no nível da proteína LF nas amostras de leite com presença de leveduras, mas sim o aumento da concentração da proteína α -LA.

A atividade antifúngica da LF também foi descrita em alguns estudos realizados *in vitro*⁷⁴⁻⁷⁷. Os efeitos fungicidas estão relacionados à capacidade de se ligar ao ferro, às interações nas membranas celulares das leveduras que levam a alterações na permeabilidade das células. A proteína LF é capaz de inibir o crescimento e matar diferentes espécies e isolados clínicos de fungos⁷⁴⁻⁷⁷.

A proteína α -LA possui diferentes funções nas células mamárias secretoras, participando da produção da enzima lactose-sintetase, responsável por catalisar a biossíntese da lactose na glândula mamária. A α -LA possui também um forte sítio de ligação ao Cálcio, sendo utilizada frequentemente como um modelo de proteína ligadora ao Cálcio⁷⁸.

Ambientes com altas concentrações de cálcio livre auxiliam na viabilidade e sobrevivência de leveduras frente a situações de estresse. Na presença de cálcio, as leveduras possuem uma maior atividade enzimática antioxidante, ocorre a diminuição do acúmulo de espécies de oxigênio reativas (ROS) nas células leveduriforme, as quais possuem efeito microbicida e ainda auxiliam na redução da injúria oxidativa intracelular⁷⁹.

Pelligrini et al.⁸⁰ também observaram a produção de três peptídeos bactericidas após a digestão proteolítica da α -LA por tripsina e quimiotripsina. Esses peptídeos demonstraram ação contra microrganismos Gram-positivos, sugerindo uma função antimicrobiana da α -LA após a digestão desta por endopeptidases. O aumento da concentração da α -LA em amostras de leite provenientes de vacas com infecção por leveduras observado no presente estudo pode ser explicado, em parte, pela produção de

peptídeos antimicrobianos, derivados de tal proteína, e ainda pela capacidade da α -LA de se ligar ao Cálcio do ambiente mamário tornando-o indisponível para a levedura, deixando esse microrganismo mais suscetível às defesas do hospedeiro. No entanto, são necessários novos estudos sobre essa relação a fim de definir e estabelecer as reais alterações no proteinograma que ocorrem em amostras de leite de vacas com mastite causada por leveduras.

Sabe-se que a resposta imunológica de um organismo frente à IIM é variável. Além de fatores relacionados ao próprio animal, ela depende também do microrganismo patogênico e do estágio da infecção. A mastite constitui uma das maiores causas de variação na composição e qualidade do leite. Dessa forma, avaliações das mudanças nos perfis de concentração de proteínas do soro de leite proveniente de vacas enfermas podem aumentar o entendimento dos efeitos da composição na produção de derivados lácteos, na biologia mamária, na função imune da glândula mamária, além de identificar potenciais biomarcadores para detecção precoce dessa enfermidade ^{71, 81, 82}.

4. CONCLUSÃO

- Infecções Intramamárias causadas por SCN, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Arcanobacterium pyogenes* não provocaram alterações estatisticamente significativa na concentração das proteínas do soro de leite de vacas em lactação
- Amostras de leite com altas CCS podem apresentar resultado negativo para cultura microbiológica;
- Os SCN apresentaram maior frequência de isolamento em amostras de leite de vacas em lactação, revelando características de oportunistas e saprófitas desse microrganismo;
- A infecção da glândula mamária causada por leveduras provoca aumento significativo da proteína α -lactoalbumina;
- São necessários novos estudos que relacionem diferentes agentes patogênicos causadores de mastite e a concentração proteica do leite, a fim de melhorar o entendimento da fisiopatologia da mastite e evidenciar a presença, ou não, de marcadores proteicos específicos para cada microrganismo visando o diagnóstico de mastite.

REFERÊNCIAS

1. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004; 35 (2): 163-87.
2. Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007; 29: 18-31
3. Zadoks R N, Allore H G, Barkema H W, Sampimon O C, Wellenberg G J, Grohn Y T Schukken Y H. Cow and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2649-63.
4. Middleton J R, Saeman A, Fox L K, Lombard J, Hogan J S, Smith K L. The National Mastitis Council: A Global Organization for Mastitis Control and Milk Quality, 50 Years and Beyond. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2014; 19 (3-4): 241-51.
5. Halasa T, Nielen M, DeRoos A P, VanHoorne R, deJong G, Lam, T J. Production loss due to one subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 599–606.
6. Azevedo C, Pacheco D, Soares L, Romão R, Moitoso M, Maldonado J, Guix R, Simões J. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Trop Anim Health Prod.* 2016; 48 (2): 451-9.
7. Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegańska M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Scientific World Journal.* 2012; 2012: 1-5.
8. Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Panorama do leite, ano 6, n. 65 – Juiz de Fora, 2012. 12p.
9. Ballou MA. Growth and development symposium: Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J Anim Sci.* 2012; 90 (5): 1466-78.
10. Hayashi T, Sugita T, Hata E, Katsuda K, Zhang E, Kiku Y, Sugawara K, Ozawa T, Matsubara T, Ando T, Obayashi T, Ito T, Yabusaki T, Kudo K, Yamamoto H, Koiwa M, Oshida T, Tagawa Y, Kawai K. Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. *J Vet Med Sci.* 2013; 75 (3): 387-90.
11. Zhao, X, Lacasse, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 2008; 86: 57–65.
12. Gerardi G, Bernardini D, Elia CA, Ferrari V, Iob L. Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Res.* 2009; 76 (4): 411-7.
13. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci- emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009; 134 (1-2): 3-8.

14. Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens – a systematic review and metanalysis. *J Dairy Sci.* 2012; 95 (11): 6483-502.
15. Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma AK, Tiwari R, Dhama K, Singh U, Kumar S. Trends in diagnosis and control os bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci.* 2013; 16: 1653-61.
16. Bi Y, Wang YJ, Qin Y, Guix Vallverdú R, Maldonado García J, Sun W, Li S, Cao Z. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLoS One.* 2016;11(5):1-13.
17. Koskinen, M. T.; Wellenberg, G. J.; Sampimon, C. O.; Holopainen, L.; Rothkamp, A.; Salmiviki, L.; Van Haeringen, W. A.; Lam, T. J. G. M.; Pyötälä, S. Fiel comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci,* 2010; 93 (12): 5707-5715.
18. Barlow, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia,* 2011; 16 (4): 383-407[acesso em 20 fev 2017].
19. Mansor R, Mullen W, Albalat A, Zerefos P, Mischak H, Barrett DC, Biggs A, Eckersall PD. A peptidomic approach to biomarker discovery for bovine mastitis. *J Proteomics.* 2013; 85: 89-98.
20. Martins R P, Silva J A G, Nakazato L, Dutra V, Filho E S A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. *Ci Anim Bras.* 2010; 11 (1): 181-7.
21. Sztachańska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19 (1): 119-24.
22. Grounlund U, Sandgren CH, Waller KP. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic subclinical mastitis. *Vet Res.* 2005; 36: 191- 7
23. Smolenski GA, Wieliczko RJ, Pryor SM, Broadhurst MK, Wheeler TT, Haigh BJ. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143 (1-2): 125-30.
24. Bueno, V. F. F.; Mesquita, A. J.; Soares, N. E.; Liveira, A. N.; Oliveira, J. P.; Neves, R. B.; Mansur, J. R. G.; Thomaz, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural,* 2005; 35 (4): 848-854.
25. Riekerink R O, Barkema H, Kelton D F, Keefe G P, Scholl D T. Risk factors for herd-level infection of contagious mastitis pathogens on Canadian dairy farms. In: 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia. 2010. [acesso em 23 fev. 2017]. Disponível em: file:///C:/Users/DELL/Downloads/T2-2.2.4%20-%20Risk%20factors%20for%20herd-level%20infection%20o.pdf.

26. Radostits O M, Gay C C, Blood D C, Hinchliff K W. *Clínica Veterinária: um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. Edição 10. Londres: Editora WB Saunders; 2007.1880p.
27. Pongthaisong P, Katawatin S, Thamrongyoswittayakul C, Roytrakul S⁵. Milk protein profiles in response to *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis in dairy cows. *Anim Sci J*. 2016; 87 (1): 92-8.
28. National Mastitis Council: *Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis*. Fort Atkinson. Ed. W. D. Hoard & Sons Co; 1987. 206p.
29. Software R. IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
30. Ogola H, Shitandi A, Nanua J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J Vet Sci*. 2007; 8(3): 237–242.
31. Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastites in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*. 2004; 87(8):2433-41.
32. Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima B M, Båge R. Prevalence of subclinical mastites in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod*. 2014, 46 (1): 99-105.
33. Shittu A, Abdullahi J, Jibril A, Mohammed A A, Fasina F O. Sub-clinical mastites and associated risk factors on lactating cows in the Savannah Region of Nigeria. *BMC Vet Res*. 2012
34. Kurjogi M M, Kaliwal B B. Epidemiology of Bovine Mastitis in Cows of Dharwad District. *Int Sch Res Notices*. 2014.
35. Zeryehun T, Abera G. Prevalence and Bacterial Isolates of Mastitis in Dairy Farms in Selected Districts of Eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia. *J Vet Med*. 2017.
36. Thompson-Crispi K A, Miglior F, Mallard B A. Incidence Rates of Clinical Mastitis among Canadian Holsteins Classified as High, Average, or Low Immune Responders. *Clin Vaccine Immunol*. 2013; 20 (1): 106-12.
37. Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I Moreno López J. Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet. Scand*. 2002; 43 (4): 221-30.
38. Nickerson S C, Oliver S P. REVIEW: How well have United States dairy producers adopted mastitis-control technologies for reducing herd somatic cell counts improving milk quality?. *Profess Animal Scient*. 2014; 30 (2): 115-24.
39. Oliveira C M C, Sousa M G S, Silva N S, Mendonça C L, Silveira J A S, Oaigen R P, Andrade A J T, Barbosa J D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras*. 2011; 3 (2): 104-10.

40. Ferreira J L, Freitas J L, Lins H A, Cavalcant T V, Macedo N A, Borjas A R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Bras.* 2007; 8 (2): 261-6.
41. Saab A B, Zamprogna T O, Lucas T M, Martini K C, Mello P L, Silva A V, Martins L A. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. *Semina.* 2014; 35 (2): 835-44.
42. Taponen S, Salmikivi I, Simojoki H, Koskinen M, Pyörälä S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci.* 2009; 92 (6): 2610-17, 2009.
43. Michel A, Syring C, Steiner A, Graber H U. Intramammary infections with the contagious *Staphylococcus aureus* genotype B in Swiss dairy cows are associated with low prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Streptococcus* spp. *Vet J.* 2011; 188 (3): 313-7.
44. Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum J W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev Veterin Med.* 2000; 44(3-4): 205-20.
45. Piepers S, Meulemeester L, Kruif A, Opsomer G, Barkema H W, De Vliegher S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res.* 2007; 74 (4): 478-83.
46. Levison L J, Miller-Cushon E K, Tucker A L, Bergeron R, Leslie K E, Barkema H W, DeVries T J. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2016; 99 (2): 1341-50.
47. Makovec J A, Ruegg P L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 3466 – 72
48. Tenhagen B, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 2542 – 51.
49. Schukken Y H, González R N, Tikofsky L L, Schulte H F, Santisteban C G, Welcome F L, Bennett G J, Zurakowski M J, Zadoks R N. CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet Microbiol.* 2009; 134: 9 – 14.
50. Moser A, Stephan R, Ziegler D, Johler S. Species distribution and resistance profiles of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2013;155 (6): 333-8.
51. Supré K, Haesebrouck F, Zadoks R N, Vanechoutte M, Piepers S, De Vliegher S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci.* 2011; 94: 2329 – 40.
52. De Vliegher S, Fox L K, Piepers S, McDougall S, Barkema H W. Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 1025 – 40.

53. Allaker R P, Whitlock M, Lloyd D H. Cytotoxic activity of *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* 1991; 26: 161 – 6.
54. Zhang S, Maddox C W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect Immun.* 2000; 68: 1102 – 8.
55. Gillespie B E, Headrick S I, Boonyayatra S, Oliver, S P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol.* 2009; 134: 65 – 72.
56. De Visscher A, Piepers S, Haesebrouck F, Supré K, De Vlieghe S. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: Prevalence, distribution, and associated subgroup- and species-specific risk factors. *J Dairy Sci.* 2017; 100 (1): 629-42.
57. Pardo R B, Sturion D J, Basile J R, Neto A F C, Duarte D D S, Fernandes A A, Yokosawa S Y, Menck R C, Godoy C A, Farinazzo A M, Panício E M. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). *J Health Sci.* 1999; 1 (1): 25-30.
58. Barbalho T C F, Mora R A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Ver Bras Saúde Prod Anim.* 2001; 2 (2): 31-6.
59. Persson Y, Nyman A K, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2011;53: 1-8.
60. Azevedo C, Pacheco D, Soares L, Moitoso M, Maldonado J, Guix R, Simões J. Prevalence of bovine milk pathogens in Azorean pastures: mobile versus fixed milking machines. *Vet Rec Open.* 2016; 3 (1): 1-6.
61. Huxley J N. *Corynebacterium bovis* – friend or foe? British Mastitis conference, 2003, Garstang, Proceedings... 2003. p. 23-34.
62. Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Róžański P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia.* 2000; 150: 5-7.
63. Wawron W, Bochniarz M, Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2010; 54: 201- 4.
64. Malinowski E, Lassa H, Kłossowska A, Smulski S, Markiewicz H, Kaczmarowski M. Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Pol J Vet Sci.* 2006 9: 191- 4.
65. Li X, Ding XZ, Wan YL, Liu YM, Du GZ. Comparative proteomic changes of differentially expressed whey proteins in clinical mastitis and healthy yak cows. *Genet Mol Res.* 2014;13(3):6593-601.
66. Thomas F C, Mullen W, Tassi R, Ramírez-Torres A, Mudaliar M, McNeilly T N, Zadoks R N, Burchmore R, David Eckersall P. Mastitomics, the integrated omics of

- bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 1. High abundance proteins, acute phase proteins and peptidomics. *Mol Biosyst.* 2016; 12 (9): 2735-47.
67. Che HX, Tian B, Bai LN, Cheng LM, Liu LL , Zhang XN, Jiang ZM, Xu XX. Development of a test strip for rapid detection of Lactoperoxidase in raw milk. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015 Aug; 16(8):672-9.
 68. Hurley W L, Theil P K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients.* 2011; 3 (4): 442-74.
 69. Ibeagha-Awemu EM, Ibeagha AE, Messier S, Zhao X. Proteomics, genomics, and pathway analyses of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infected milk whey reveal molecular pathways and networks involved in mastitis. *J Proteome Res.* 2010; 9 (9): 4604-19.
 70. Alonso-Fauste I, Andrés M, Iturralde M, Lampreave F, Gallart J, Álava MA. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J Proteomics,* 2012; 75 (10): 3015-3030.
 71. Reinhardt, T.A.; Sacco, R.E.; Nonnecke, B.J.; Lippolis, J.D. Bovine milk proteome: Quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics,* 2013; 26 (82): 141-154.
 72. Smolenski G A, Broadhurst M K, Stelwagen K, Haigh B J, Wheeler T T. Host defence related responses in bovine milk during an experimentally induced *Streptococcus uberis* infection. *Proteome Sci.* 2014;12 (19): 1-14.
 73. Alnakip M E, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J Vet Med.* 2014; 2014: 1-31.
 74. Kuipers M E, de Vries H G, Eikelboom M C, Meijer D K, Swart P J. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (11): 2635-41.
 75. Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferrin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 1993; (182):97–105.
 76. Kirkpatrick C H, Green I, Rich R R, Schade A L. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *J Infect Dis.* 1971; (124):539–44.
 77. Andrés M T, Acosta-Zaldívar M, Fierro J F. Antifungal Mechanism of Action of Lactoferrin: Identification of H⁺-ATPase (P3A-Type) as a New Apoptotic-Cell Membrane Receptor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60 (7): 4206-16.

78. Permyakov E A, Berlinder L J.A-Lactalbumin: structure and function. *Febs Letters*. 2000; 473:269-74.
79. An B, Li B, Qin G, Tian S. Exogenous calcium improves viability of biocontrol yeasts under heat stress by reducing ROS accumulation and oxidative damage of cellular protein. *Curr Microbiol*. 2012; 65 (2): 122-7
80. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426 (3): 439-48.
81. Akerstedt M, Forsbäck L, Larsen T, Svennersten-Sjaunja K. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res*, 2011; 78 (1): 88-96.
82. Reinhardt TA, Lippolis JD, Nonnecke BJ, Sacco RE. Bovine milk exosome proteome. *J Proteomics*. 2012; 75 (5): 1486-92.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite é um dos alimentos mais completos e com maior riqueza de nutrientes utilizados na dieta humana, além de constantemente relacionado entre as principais fontes de cálcio, proteína e vitaminas para o organismo. Os componentes químicos do leite, proteína, gordura e lactose, além dos minerais e vitaminas, são importantes na nutrição humana, tanto para crianças quanto para adultos e idosos. Dessa forma, sua obtenção com qualidade sanitária, nutricional e sensorial é necessária para a produção de alimentos seguros, livres de contaminações e que não levem risco à saúde do consumidor.

Para a obtenção de leite de qualidade é necessário que as atividades sejam baseadas nos princípios de higiene de ordenha, sanidade e bem-estar animal. A industrialização e o processamento de leite e derivados também devem ter como base as práticas higiênicas, visto a importância desse alimento e as consequências ocasionadas por produtos com qualidade sanitária inadequada.

Neste contexto, recomenda-se a utilização de Boas práticas agropecuárias (BPA), um conjunto de ações auxiliam na obtenção higiênica do leite, uma vez que práticas higiênicas inadequadas durante a ordenha e no ambiente culminam com o aumento da contaminação microbológica, o que resulta em alterações físico-químicas como o aumento da acidez, diminuição da concentração de determinados componentes nutricionais, diminuição da estabilidade térmica, entre outros.

As BPA também englobam a sanidade e o bem-estar animal, relacionado ao cumprimento do calendário vacinal da propriedade, alimentação adequada de acordo com as necessidades energéticas e de produção da vaca, manejo ambiental e reprodutivo e o monitoramento e controle das mastites clínica e subclínica nas vacas do rebanho.

A mastite, clínica ou subclínica, ainda é um problema nos rebanhos leiteiros de todo o mundo, estando relacionada com a eficiência produtiva e econômica das propriedades leiteiras. O aumento dos custos de produção em rebanhos com altas taxas de mastite é frequente, sendo relacionados às despesas com diagnóstico, por meio de realização de análises de Contagem de Células Somáticas (CCS) e análises microbológicas para detecção do patógeno causador da enfermidade, além daqueles inerentes à mão-de-obra especializada e ao tratamento medicamentoso. Associado ao aumento dos custos de produção tem-se, ainda, a redução do volume da produção de leite nas vacas enfermas, a perda da capacidade secretora da glândula mamária do quarto mamário infectado e o descarte de animais com enfermidade crônica.

O diagnóstico de vacas com mastite subclínica é de suma importância em um sistema de produção leiteira, visto que a enfermidade interfere negativamente na qualidade do leite. Mundialmente vacas com valor de CCS maior que 200.000cel/ mL são consideradas enfermas, com um quadro de mastite subclínica em pelo menos um dos quartos mamários. Outros testes de diagnósticos utilizados são o de *California Mastitis Test* e o *Wisconsin Mastitis Test*, métodos de diagnósticos indiretos que utilizam a reação das células somáticas aos reagentes dos testes para determinar o grau de mastite subclínica nas vacas.

Apesar da análise de CCS ser o padrão ouro para diagnóstico de mastites subclínicas, seu resultado pode ser influenciado por outros fatores, como idade da vaca, número de lactações e estágio de lactação, além de outros. Assim, novos indicadores de mastite subclínica são necessários para tornar o diagnóstico mais eficiente e preciso. As proteínas presentes no leite podem ser consideradas um novo caminho para o diagnóstico desta enfermidade, visto que a concentração de determinadas proteínas de defesa do soro de leite podem aumentar na ocorrência de mastite subclínica.

Existem várias técnicas para detecção, quantificação e identificação de proteínas em amostras de material biológico. A técnica de eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*, utilizada no presente estudo se mostrou eficiente na identificação, discriminação e quantificação de proteínas do soro lácteo. A partir de nossos resultados foi possível observar diferentes expressões proteicas em amostras de leite de vacas em diferentes condições de saúde.

No presente estudo, foi possível observar diferenças na expressão de proteínas com atividades antimicrobianas em amostras de leite de vacas com mastite subclínica, principalmente, em amostras de leite com CCS acima de 500.000 cel/ mL. As proteínas Lactoferrina e Imunoglobulina G têm a concentração aumentada em amostras de leite de vacas com a enfermidade. No entanto, quando se investigou a presença do microrganismo causador da enfermidade e a expressão das proteínas do soro de leite não foi possível observar diferenças no perfil de proteínas entre amostras de leite de vacas com isolamento bacteriano e amostras de leite de vacas sem isolamento bacteriano.

A realização de análises de identificação de proteínas para observação de alterações do perfil de proteínas do soro de leite de vacas com altas CCS pode auxiliar na compreensão das mudanças na composição proteica do leite de vacas com mastites, além de melhorar o entendimento sobre os efeitos da composição no processamento de derivados lácteos, na função biológica mamária, na função imune da glândula mamária, bem como na

identificação de biomarcadores para detecção precoce dessa doença de grande impacto econômico.

A utilização de biomarcadores proteicos para detecção e monitoramento de diferentes enfermidades humanas e animais vem sendo estudada. Para mastite bovina, a identificação de biomarcadores proteicos que auxiliem no diagnóstico, e que provêm informações sobre o prognóstico da enfermidade e sobre a resposta imunológica frente à infecção pode ser um grande avanço para a pecuária leiteira. Tais biomarcadores podem ser utilizados para o desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico que podem ser utilizados na fazenda, facilitando a interpretação da detecção da enfermidade, a decisão do uso de antibióticos e ainda a recuperação da saúde do animal.

Portanto, os dados obtidos no presente estudo confirmam a existência de proteínas do soro de leite de vacas como alvos em potencial para biomarcadores a serem empregados no diagnóstico de mastite e fornece subsídio para os estudos da aplicação destas proteínas e de sua viabilidade na prática rotineira das propriedades leiteiras.