

JÉSSICA LOBO ALBUQUERQUE CALDEIRA

**"MASTITE CAPRINA POR *Staphylococcus warneri*: UMA ABORDAGEM
MULTIFATORIAL NO ESTUDO DA INFECÇÃO"**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Coorientador: Tiago Antonio de Oliveira
Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C146m
2024 Caldeira, Jéssica Lobo Albuquerque, 1992-
Mastite caprina por *Staphylococcus warneri* : uma
abordagem multifatorial no estudo da infecção / Jéssica Lobo
Albuquerque Caldeira. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (104 f.): il. (algumas color.).

.
Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 35-45.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.116>

Modo de acesso: Word Wide Web.

1. Caprinos - Doenças. 2. Mastite - Diagnóstico. I. Moreira,
Maria Aparecida Scatamburlo, 1963-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22 ed. 636.391


JÉSSICA LOBO ALBUQUERQUE CALDEIRA

"MASTITE CAPRINA POR *Staphylococcus warneri*: UMA ABORDAGEM MULTIFATORIAL NO ESTUDO DA INFECÇÃO"


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 JESSICA LOBO ALBUQUERQUE CALDEIRA
Data: 18/03/2024 12:08:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jéssica Lobo Albuquerque Caldeira
Autor

Documento assinado digitalmente
 MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREIRA
Data: 18/03/2024 12:37:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Autor da vida, por ser aquele que dá sentido a tudo que faço.

À minha família, em especial meu esposo e filha, por serem os principais incentivadores e motivadores da minha jornada profissional.

À família IPV e aos amigos mais chegados que irmãos que ali encontrei.

À professora Cida, por ser além de uma orientadora uma amiga que se alegra por nossas conquistas.

À toda equipe do LDBAC, estagiários, IC's, colegas de pós-graduação que me auxiliaram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

Aos amigos conquistados nessa caminhada científica, em especial a Mari e a Lane por além de me auxiliarem com a pesquisa estavam ali para ouvir desabafos.

À toda equipe da Medicina Veterinária Preventiva, professores, técnicos de laboratório, e em especial "Seu Luis", por estarem dispostos a nos auxiliarem com as nossas demandas de pesquisa, além de pausas necessárias com cafezinho para descontrair.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de produtividade à orientadora Maria Aparecida S. Moreira e apoio financeiro à pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Jéssica Lobo Albuquerque Caldeira, filha de Audineide Barros Lobo, nasceu em São Luís, Maranhão, em 25 de agosto de 1992.

Durante o ensino médio no Liceu Marenhense, uma respeitável instituição pública, demonstrou uma forte inclinação para as ciências biológicas.

Em 2011, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Durante seus anos acadêmicos, destacou-se como monitora da disciplina de Histologia e realizou estágios em clínicas de pequenos e grandes animais, além de laboratórios de patologia clínica e microbiologia. Participou também de projetos de iniciação científica focado em Medicina Veterinária Preventiva, concentrando-se em estudos sobre Diarreia Viral Bovina (BVDV) em rebanhos bovinos e Leptospirose em rebanhos caprinos e ovinos da região.

Em 2016, realizou aprimoramento em Clínica Médica e Cirúrgica de grandes animais na UEMA.

No ano de 2017, ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, com foco em Biotecnologia, Diagnóstico e Controle de Doenças dos Animais. Sob a orientação da professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, desenvolveu sua dissertação intitulada “Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* com células espermáticas bovinas e a correlação com proteínas de membrana do complexo 85”, resultando na publicação de um artigo subsequente na revista *Theriogenology*.

Em 2019, iniciou seu doutorado na mesma linha de pesquisa e orientação, porém direcionando seus estudos para a mastite caprina e suas diversas problemáticas, desdobramento de um projeto anterior que culminou na pesquisa atual.

RESUMO

CALDEIRA, Jéssica Lobo Albuquerque, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2023. **Mastite Caprina por *Staphylococcus warneri*: Uma Abordagem Multifatorial no Estudo da Infecção**. Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientador: Tiago Antonio de Oliveira Mendes

A mastite, inflamação da glândula mamária, emerge como um desafio na pecuária leiteira, impactando negativamente a produção e a qualidade do leite. Este trabalho aborda essa questão complexa em três capítulos em formato de artigo, cada um com foco específico e contribuições distintas para o entendimento da dinâmica da infecção na mastite caprina. Para isso, trabalhamos com 112 amostras de leite oriundas de sete cabras primíparas da raça Parda Alpina, das quais seis foram submetidas à infecção experimental intramamária com uma dose de $1,2 \times 10^8$ UFC/ml do isolado de *S. warneri* e uma serviu como controle negativo. O primeiro capítulo investigou o impacto da infecção experimental por *Staphylococcus warneri* nas alterações dos elementos químicos do leite bem como na presença de patógenos nos caprinos infectados. Utilizou-se PCR em tempo real para detecção de patógenos e utilizamos a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) como parâmetros de infecção. Elementos químicos foram analisados via Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplada ao MEV. Os resultados revelaram diferenças entre o lado do úbere infectado e o não infectado durante os dias de desenvolvimento da infecção tanto para os elementos quanto para a presença de patógenos. O cloro apresentou maior concentração no lado infectado do úbere no segundo dia, enquanto cálcio e ferro exibiram variações ao longo dos dias de infecção. Correlações específicas foram estabelecidas entre diferentes patógenos e elementos químicos. A infecção experimental por *S. warneri* impactou a microbiota, com uma maior variedade de patógenos nos animais infectados bem como no úbere infectado, além de variações entre os elementos químicos entre o lado do úbere infectado e não infectado, sendo um trabalho pioneiro nessa abordagem. No segundo capítulo, abordamos a atividade da enzima N-acetil-β-glucosaminidase (NAGase) como uma ferramenta diagnóstica para mastite caprina. Amostras oriundas da infecção experimental e 49 amostras de animais naturalmente infectados foram utilizados neste estudo. Aplicamos o método fluorométrico para quantificar a enzima NAGase além de citometria de fluxo para a CCS e CBT que foram utilizados como parâmetro da evolução da infecção. A análise revelou aumento da NAGase em cabras infectadas

com *S. warneri*, destacando-se como uma ferramenta útil para o monitoramento da doença. Além disso, ao combinarmos o NAGase com a CCS, obtivemos um melhor resultado na classificação da mastite em amostras de campo. Essa abordagem multidimensional contribui para aprimorar estratégias de diagnóstico e tratamento da mastite. O terceiro capítulo investigou a liberação de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) por neutrófilos caprinos estimulados in vitro por *Staphylococcus aureus* e *S. warneri*. Neste capítulo, sangue de cabras adultas saudáveis foram coletados e utilizado no isolamento de neutrófilos polimorfonucleares caprino (PMNs). Avaliamos a formação NETs caprinos induzindo as células sob estímulos de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), citocalasina para inibição da fagocitose, *S. warneri* e *S. aureus*. Esses dois patógenos comuns da mastite caprina desencadearam a formação de NETs, sugerindo um mecanismo de defesa celular contra a mastite, sendo um achado inédito na literatura. Essa resposta dos neutrófilos destaca nuances distintas na defesa imunológica, oferecendo uma perspectiva valiosa para futuras estratégias terapêuticas. Em conclusão, esses achados contribuem significativamente para avanços na compreensão e no manejo sanitário caprino, destacando a necessidade contínua de abordagens multidisciplinares para enfrentar esse desafio complexo na pecuária leiteira.

Palavras-chave: Ruminantes. Mastite. Leite. Diagnóstico. Resposta imune.

ABSTRACT

CALDEIRA, Jéssica Lobo Albuquerque, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2023. **Caprine mastitis for *Staphylococcus warneri*: A multifactorial approach in the study of the infection.** Advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisor: Tiago Antonio de Oliveira Mendes

Mastitis, inflammation of the mammary gland, emerges as a challenge in dairy farming, negatively affecting milk production and quality. This work addresses this complex issue in three article-style chapters, each with a specific focus and distinct contributions to understanding the dynamics of infection in goat mastitis. To achieve this, we worked with 112 milk samples from seven primiparous goats of the Parda Alpina breed, of which six were subjected to experimental intramammary infection with a dose of 1.2×10^8 CFU/ml of the *Staphylococcus warneri* isolate and one served as negative control. The first chapter investigated the impact of experimental infection by *S. warneri* on changes in chemical elements in milk as well as the presence of pathogens in infected goats. Real-time PCR was used to detect pathogens and we used Somatic Cell Count (SCC) and Total Bacterial Count (CBT) as infection parameters. Chemical elements were analyzed via Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) coupled to SEM. The results revealed differences between the infected and non-infected side of the udder during the days of infection development for both the elements and the presence of pathogens. Chlorine showed a higher concentration on the infected side of the udder on the second day, while calcium and iron showed variations over the days of infection. Specific correlations have been established between different pathogens and chemical elements. Experimental infection by *S. warneri* impacted the microbiota, with a greater variety of pathogens in infected animals as well as in the infected udder, in addition to variations between chemical elements between the infected and non-infected side of the udder, being a pioneering work in this approach. In the second chapter, we address the activity of the enzyme N-acetyl- β -glucosaminidase (NAGase) as a diagnostic tool for goat mastitis. Samples from experimental infection and 49 samples from naturally infected animals were used in this study. We applied the fluorometric method to quantify the NAGase enzyme in addition to flow cytometry for CCS and CBT, which were used as a parameter for the evolution of the infection. The analysis revealed an increase in NAGase in goats infected with *S. warneri*, highlighting it as a useful tool for monitoring the disease. Furthermore, by combining NAGase with CCS, we obtained a better result in classifying mastitis in field samples. This multidimensional approach

contributes to improving mastitis diagnosis and treatment strategies. The third chapter investigated the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) by goat neutrophils stimulated in vitro by *Staphylococcus aureus* and *S. warneri*. In this chapter, blood from healthy adult goats was collected and used in the isolation of goat polymorphonuclear neutrophils (PMNs). We evaluated the formation of goat NETs by inducing cells under stimuli of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cytochalasin for inhibition of phagocytosis, *S. warneri* and *S. aureus*. These two common pathogens of goat mastitis triggered the formation of NETs, suggesting a cellular defense mechanism against mastitis, an unprecedented finding in the literature. This neutrophil response highlights distinct nuances in immune defense, offering a valuable perspective for future therapeutic strategies. In conclusion, these findings contribute significantly to advances in goat health understanding and management, highlighting the continued need for multidisciplinary approaches to address this complex challenge in dairy farming.

Keywords: Ruminants. Mastitis. Milk. Diagnosis. Immune Response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. REFERÊNCIAS	15
2. CAPÍTULO 1: <i>Staphylococcus warneri</i>: relação nas alterações da microbiota e dos elementos químicos do leite em caprinos	21
2.1. INTRODUÇÃO	23
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.2.1. Amostras	25
2.2.2. Extração de DNA e PCR em tempo real	26
2.2.3. Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total	27
2.2.4. Elementos Químicos	27
2.2.5. Análise estatística	28
2.3. RESULTADOS	29
2.3.1. PCR em tempo Real	29
2.3.2. CCS, CBT e correlação com presença de micro-organismos	33
2.3.3. Elementos químicos e correlação com a presença de micro-organismos 35	
2.4. DISCUSSÃO	41
2.4.1. Microbiota e correlação com CCS e CBT	41
2.4.2. Elementos químicos e correlação com a presença de micro-organismos 43	
2.5. CONCLUSÃO	48
2.6. AGRADECIMENTOS	48
2.7. REFERÊNCIAS	49
2.8. MATERIAL SUPLEMENTAR	54
3. CAPÍTULO 2: N-acetil-β-glucosaminidase aliado no diagnóstico de mastite caprina	61
3.1. INTRODUÇÃO	63
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.2.1. Amostras	64
3.2.1.1. Infecção Experimental	64
3.2.1.2. Animais de campo	65
3.2.2. Atividade de N-acetyl- β -D-glucosaminidase	66
3.2.2.1. Curva padrão	66
3.2.3. Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total	67
3.2.4. Análise estatística	67

3.3.	RESULTADOS	68
3.3.1.	Infecção Experimental	68
3.3.2.	Animais de campo	71
3.4.	DISCUSSÃO	73
3.4.1.	Infecção experimental	73
3.4.2.	Animais de campo	75
3.5.	CONCLUSÃO	76
3.6.	AGRADECIMENTOS	77
3.7.	REFERÊNCIAS	77
3.8.	MATERIAL SUPLEMENTAR	82
4.	CAPÍTULO 3: Mastite caprina e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)	83
4.1.	INTRODUÇÃO	85
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	87
4.2.1.	Preparo bacteriano	87
4.2.2.	Isolamento de neutrófilos polimorfonucleares caprino	88
4.2.3.	Formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos <i>in vitro</i>	88
4.2.4.	Análises estatísticas	89
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.4.	CONCLUSÃO	96
4.5.	AGRADECIMENTOS	96
4.6.	REFERÊNCIAS	96
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criação de pequenos ruminantes, em particular a caprinocultura leiteira, destaca-se como uma atividade com um potencial notável para desempenhar funções sociais e culturais essenciais em várias partes do mundo. (Danmalla & Pimenov, 2019). A criação de cabras para a produção de leite é uma característica distintiva das regiões tropicais e áridas, que abrigam aproximadamente 61% da população caprina global. Importante notar que muitos desses países são classificados pela FAO como nações de baixa renda e com déficits alimentares, o que ressalta ainda mais a importância crucial dessa atividade como meio de subsistência nessas áreas (Pulina et al., 2018).

Por outro lado, a caprinocultura leiteira também é presente em nações de elevado rendimento e avançado desenvolvimento tecnológico, como a França, Grécia, Itália e Espanha. Esses países são responsáveis por 9,4% do leite de cabra mundial (FAOSTAT, 2018). Esse produto é frequentemente convertido em derivados lácteos nas fazendas para atender às demandas dos mercados locais, com o leite processado sendo vendido localmente e alguns queijos de leite de cabra com denominação de origem protegida (DOP) exportados, além do leite desidratado (Pulina et al., 2018). Isso ressalta sua versatilidade em diversas áreas, mantendo um papel importante no desenvolvimento das comunidades rurais.

No Brasil, a caprinocultura desempenha um papel econômico e social significativo tanto para pequenos quanto para grandes produtores (Santos et al., 2019). Com um rebanho total de aproximadamente 11.923.630 cabeças, cerca de 90% estão concentrados principalmente na região Nordeste (IBGE, 2021) sendo boa parte de rebanhos para subsistência. Ao focarmos nos estabelecimentos que envolvem a ordenha de cabras, observamos uma clara predominância regional, com aproximadamente 83% deles localizados na mesma região (IBGE, 2018). Perdigão et al. (2016) indicam que na região Nordeste, programas governamentais de compra têm beneficiado pequenos produtores, promovendo um sistema mais organizado para aquisição, industrialização e distribuição de leite.

Atualmente, produtores das principais bacias leiteiras da região Nordeste estão buscando oportunidades para escoar o excedente de produção e aumentar a renda, enfrentando o desafio de explorar novos mercados para

produtos lácteos caprinos. A região Sudeste também desempenha um papel relevante, representando aproximadamente 11% dos estabelecimentos dedicados a essa atividade no país (IBGE, 2018). Na região Sudeste, destacam-se indústrias de atuação regional e até mesmo nacional, bem como produtores verticalizados que fornecem para nichos de mercado nos grandes centros urbanos (Perdigão, Oliveira e Cordeiro, 2016). Dessa forma, fica evidente que a caprinocultura é uma atividade pecuária de grande valor para produtores de todos os tamanhos em todo o Brasil.

Dentro deste cenário, assim como no rebanho leiteiro bovino, a mastite é um dos principais entraves na produção. Mastite por definição é a inflamação da glândula mamária que afeta não apenas tecidos intramamários, mas também estruturas anatômicas relacionadas, como mamilos, aréolas mamárias e dutos de leite, e geralmente é causada por um patógeno. Essa condição representa um dos principais desafios em termos de saúde animal para rebanhos leiteiros, resultando em significativas reduções na produção e qualidade do leite, bem como em custos relacionados à reposição de animais e despesas veterinárias. (Contreras & Rodríguez, 2011; Koop et al., 2010).

Em relação aos sinais clínicos, a mastite pode se apresentar de forma clínica ou subclínica. Quando se trata da sua causa, as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são os principais agentes causadores da mastite caprina e estão associadas a todas as suas formas de manifestação (Contreras et al., 2007a; Nelli et al., 2022).

No rebanho caprino, a mastite subclínica é mais comum, com uma incidência que pode ultrapassar 30%, enquanto a forma clínica é menos frequente, com uma incidência de menos de 5%, embora geralmente apresente sinais clínicos mais graves do que em bovinos (Kahinda & Kahinda, 2021). A mastite subclínica é predominantemente causada por estafilococos coagulase-negativos (SCN), considerados menos patogênicos, incluindo *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus warneri* (Andrade et al., 2021; Rosa et al., 2022; Salaberry et al., 2015). Em contrapartida, a mastite clínica é principalmente causada por *Staphylococcus aureus* e geralmente resulta em casos agudos (Contreras et al., 2007a; Kahinda & Kahinda, 2021).

Staphylococcus warneri é uma bactéria comumente encontrada na flora normal da pele e membranas mucosas de humanos e animais (Nagase et al., 2002). Além de sua presença como comensal, *S. warneri* tem sido associado a uma variedade de infecções oportunistas, incluindo casos de bacteremia, sepsis com múltiplos abscessos, infecções ortopédicas, osteomielite vertebral e infecções de derivação ventricular em pacientes imunocomprometidos (Bryan et al., 1987; Kamath et al., 1992; Martínez-Lage et al., 2010; Ivić et al., 2013; Campoccia et al., 2018). Além disso, relatórios clínicos sugerem sua implicação em casos de aborto bovino (Barigye et al., 2007) e sua presença frequente em casos de mastite em ruminantes domésticos (Hosseinzadeh & Dastmalchi Saei, 2014; Krishnamoorthy et al., 2016; Zigo et al., 2022).

Uma característica distintiva de *S. warneri* é a presença de exoenzimas, como as proteases *sspA* e *sspB*, que são comuns em *S. aureus*, mas geralmente ausentes em cepas de estafilococos coagulase-negativos (SCN) (Nickerson et al., 2007; Yokoi et al., 2016). Essas proteases extracelulares, conhecidas por seu papel na virulência do *S. aureus* (Kolar et al., 2013), podem sugerir mecanismos semelhantes na patogênese do *S. warneri* (Liu et al., 2020).

Pesquisas recentes sobre a patogênese de infecções por *S. warneri* revelaram que isolados sanguíneos têm capacidade de adesão celular e formação de biofilme, com expressão de vários genes de resistência a antibióticos (Szczyka et al., 2016). Essa resistência a múltiplos antibióticos em cepas de *S. warneri* levanta preocupações sobre o tratamento da mastite e a propagação da resistência antimicrobiana (Hoque et al., 2023).

Estudos de Vasil et al. (2016) em amostras de leite bovino indicaram que infecções por *S. warneri* e *S. xylosus* podem alterar a composição do leite, reduzindo os níveis de proteína e matéria seca, ao mesmo tempo em que aumentam o número de células somáticas e os níveis de ureia.

A disponibilidade de sequências genômicas completas de cepas de *S. warneri*, como a cepa SG1 isolada em 2013 no Canadá (Cheng et al., 2013) ressalta a importância contínua da pesquisa para entender esse micro-organismo. Embora *S. warneri* e outros estafilococos coagulase-negativos tenham sido associados à mastite em ruminantes domésticos, seu papel específico e patogenicidade em comparação com patógenos mais conhecidos, como *S. aureus*, ainda são áreas de investigação ativa (Hoque et al., 2023).

A disbiose, que envolve a quebra do equilíbrio na microbiota composta por bactérias comensais e patogênicas, emerge como um fator crucial no desenvolvimento da mastite em ruminantes domésticos (Castro et al., 2019; Ilectra A. Fragkou et al., 2007). Estudos recentes sugerem que a Infecção Intramamária (IMI) não é exclusivamente causada por um único patógeno, mas pode desencadear alterações na microbiota local, impulsionando o desenvolvimento da mastite, inclusive em caprinos (Contreras & Rodríguez, 2011; Polveiro et al., 2020), o que demonstra mais uma faceta complexa da mastite.

Os neutrófilos desempenham um papel essencial como mecanismo de defesa do hospedeiro em relação à mastite, migrando do sangue para o leite e empregando diversas estratégias, incluindo a formação de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Essas NETs desempenham uma função importante na prevenção da disseminação dos patógenos (Seeley et al., 2012), contribuindo inclusive para o processo de eliminação de patógenos na glândula mamária em mastite bovina (Grinberg et al., 2008; Swain et al., 2014), porém pouco estudado em caprinos.

No diagnóstico e tratamento da mastite caprina, é crucial combinar avaliações que detectem a inflamação e identifiquem prontamente o agente causador. No entanto, os testes comuns em rebanhos leiteiros bovinos, como o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS), têm limitações quando aplicados a rebanhos caprinos. Isso ocorre porque a variação celular no leite caprino é significativamente maior, influenciada pela paridade, raça, estágio de lactação, pela variedade de patógenos que afetam a glândula mamária, além do tipo de secreção glandular mamária apócrina desses animais (Bergonier et al., 2003). Assim vemos a crescente procura por análises mais precisas nesses animais. A enzima NAGase tem se destacado como um indicador eficiente para o diagnóstico de mastite em ruminantes, incluindo cabras. Estudos evidenciaram que a atividade de NAGase é mais elevada no leite de animais afetados por mastite, mesmo em casos subclínicos provocados por SCN (Maisi, 1990; Barth et al., 2010; Kumar et al., 2019). No entanto, há a necessidade de estabelecer pontos de corte para classificação dos animais para que haja uma contribuição efetiva no diagnóstico caprino.

Percebemos assim que a mastite é uma doença multifatorial com interações complexas entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos. Em caprinos, as infecções mamárias apresentam desafios significativos, e compreender seu comportamento é crucial para identificar soluções. Nessa perspectiva, hipotetiza-se que a infecção intramamária por *Staphylococcus warneri*, que faz parte do grupo SCN principal causa de mastite subclínica em caprinos, leva a potenciais alterações no leite que ao serem detectadas podem auxiliar no manejo, diagnóstico e tratamento da doença. Além disso, busca compreender os aspectos imunológicos envolvidos na mastite caprina.

Assim, este estudo tem como objetivo analisar as características multifatoriais da infecção intramamária por *Staphylococcus warneri* em caprinos por meio de diversas ferramentas.

1.1. REFERÊNCIAS

Andrade, N. C., Laranjo, M., Costa, M. M., & Queiroga, M. C. (2021). Virulence Factors in *Staphylococcus* Associated with Small Ruminant Mastitis: Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 633, 10(6), 633. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060633>.

Barigye, R., Schaan, L., Gibbs, P. S., Schamber, E., & Dyer, N. W. (2007). Diagnostic evidence of *Staphylococcus warneri* as a possible cause of bovine abortion. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(6), 694–696. <https://doi.org/10.1177/104063870701900613>.

Bergonier, D., de Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., & Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, 34(5), 689–716. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003030>

Bryan, C. S., Parisi, J. T., & Strike, D. G. (1987). Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus warneri* attributed to a hickman catheter. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 8(1), 57–59. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90048-4)

Campoccia, D., Montanaro, L., Visai, L., Corazzari, T., Poggio, C., Pegreffi, F., Maso, A., Pirini, V., Ravaioli, S., Cangini, I., Speziale, P., & Arciola, C. R. (2018). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. <https://doi.org/10.1177/039139881003300903>, 33(9), 575–581. <https://doi.org/10.1177/039139881003300903>

Castro, I., Alba, C., Aparicio, M., Arroyo, R., Jiménez, L., Fernández, L., Arias, R., & Rodríguez, J. M. (2019). Metataxonomic and immunological analysis of milk from ewes with or without a history of mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 9298–9311. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16403>

Cheng, V. W. T., Zhang, G., Oyedotun, K. S., Ridgway, D., Ellison, M. J., & Weiner, J. H. (2013). Complete Genome of the Solvent-Tolerant *Staphylococcus warneri* Strain SG1. *Genome Announcements*, 1(2), 38–51. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00038-13>

Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., & Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.011>

Contreras, G. A., & Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339–356. <https://doi.org/10.1007/S10911-011-9234-0/FIGURES/3>

Danmallam, F. A., & Pimenov, N. V. (2019). Study on prevalence, clinical presentation, and associated bacterial pathogens of goat mastitis in Bauchi, Plateau, and Edo states, Nigeria. *Veterinary World*, 12(5), 638–645. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.638-645>

Hoque, M. N., Faisal, G. M., Das, Z. C., Sakif, T. I., Al Mahtab, M., Hossain, M. A., & Islam, T. (2023). Genomic features and pathophysiological impact of a multidrug-resistant *Staphylococcus warneri* variant in murine mastitis. *Microbes and Infection*, 105285. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2023.105285>

Hosseinzadeh, S., & Dastmalchi Saei, H. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.IJVSM.2014.02.001>

IBGE. Censo agropecuário: resultados definitivos. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2018/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em 15 de set de 2023.

IBGE. Censo agropecuário: resultados definitivos. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2021/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em 15 de set de 2023.

Ivić, I., Karanović, J., & Pavičić-Ivelja, M. (2013). Sepsis with multiple abscesses caused by staphylococcus warneri: A case report. *Central European Journal of Medicine*, 8(1), 45–47. <https://doi.org/10.2478/S11536-012-0066-0/MACHINEREADABLECITATION/RIS>

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2018 Statistics database (2018) <http://www.fao.org/faostat/en/#data>, Acesso em 5 de set de 2023.

Ilectra A. Fragkou, Vasia S. Mavrogianni, Peter J. Cripps, Dimitris A. Gougoulis, & George C. Fthenakis. (2007). The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis. *Vet. Res.*, 38(4), 525–545. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007014>

Kahinda, C. T. M., & Kahinda, C. T. M. (2021). Mastitis in Small Ruminants. Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.97585>

Kamath, U., Singer, C., & Isenberg, H. D. (1992). Clinical significance of Staphylococcus warneri bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2), 261–264. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.2.261-264.1992>

Kolar, S. L., Antonio Ibarra, J., Rivera, F. E., Mootz, J. M., Davenport, J. E., Stevens, S. M., Horswill, A. R., & Shaw, L. N. (2013). Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *MicrobiologyOpen*, 2(1), 18–34. <https://doi.org/10.1002/MBO3.55>

Koop, G., Dik, N., Nielen, M., & Lipman, L. J. A. (2010). Short communication: Repeatability of differential goat bulk milk culture and associations with somatic cell count, total bacterial count, and standard plate count. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2569–2573. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2705>

Liu, C., Zhao, X., Xie, H., Zhang, X., Li, K., Ma, C., & Fu, Q. (2020). Whole genome sequence and comparative genome analyses of multi-resistant *Staphylococcus warneri* GD01 isolated from a diseased pig in China. *PLOS ONE*, 15(5), e0233363. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233363>

Martínez-Lage, J. F., Martínez-Lage Azorín, L., & Almagro, M. J. (2010). *Staphylococcus warneri* ventriculoperitoneal shunt infection: Failure of diagnosis by ventricular CSF sampling. *Child's Nervous System*, 26(12), 1795–1798. <https://doi.org/10.1007/S00381-009-1050-0/METRICS>

Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S., & Kawano, J. (2002). Isolation and Species Distribution of *Staphylococci* from Animal and Human Skin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(3), 245–250. <https://doi.org/10.1292/JVMS.64.245>

Nelli, A., Voidarou, C., Venardou, B., Fotou, K., Tsinas, A., Bonos, E., Fthenakis, G. C., Skoufos, I., & Tzora, A. (2022). Antimicrobial and Methicillin Resistance Pattern of Potential Mastitis-Inducing *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolates from the Mammary Secretion of Dairy Goats. *Biology* 2022, Vol. 11, Page 1591, 11(11), 1591. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11111591>

Nickerson, N. N., Prasad, L., Jacob, L., Delbaere, L. T., & McGavin, M. J. (2007). Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus* proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism and is dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34129–34138. <https://doi.org/10.1074/JBC.M705672200>

Perdigão, N. R., O. F.; Oliveira, L. S.; Cordeiro, A. G. P. C. (2016). Sistema de produção de caprinos leiteiros. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO DE CAPRINOS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA, 13., 8 e 9 de julho de 2016. Anais [...]. Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos.

Polveiro, R. C., Vidigal, P. M. P., Mendes, T. A. de O., Yamatogi, R. S., Lima, M. C., & Moreira, M. A. S. (2020). Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61407-2>

Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L., Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-14015>

Rosa, N. M., Penati, M., Fusar-Poli, S., Addis, M. F., & Tola, S. (2022). Species identification by MALDI-TOF MS and gap PCR-RFLP of non-aureus *Staphylococcus*, *Mammaliicoccus*, and *Streptococcus* spp. associated with sheep and goat mastitis. *Veterinary Research*, 53(1), 84. <https://doi.org/10.1186/S13567-022-01102-4/FIGURES/1>

Salaberry, S. R. S., Saidenberg, A. B. S., Zuniga, E., Melville, P. A., Santos, F. G. B., Guimarães, E. C., Gregori, F., & Benites, N. R. (2015). Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microbial Pathogenesis*, 85, 35–39. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2015.05.007>

Szczuka, E., Krzysińska, S., & Kaznowski, A. (2016). Clonality, virulence and the occurrence of genes encoding antibiotic resistance among *Staphylococcus warneri* isolates from bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 828–836. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000287/CITE/REFWORKS>

Vasil, M., Pecka-Kielb, E., Elečko, J., Zachwieja, A., Zawadzki, W., Zigo, F., Illek, J., & Farkašová, Z. (2016). Effects of udder infections with *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus warneri* on the composition and physicochemical changes in cows milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), 841–848. <https://doi.org/10.1515/PJVS-2016-0105>

Yokoi, K. J., Kuzuwa, S., Iwasaki, S. I., Yamakawa, A., Taketo, A., & Kodaira, K. I. (2016). Aureolysin of *Staphylococcus warneri* M accelerates its proteolytic cascade, and participates in biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(6), 1238–1242. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1148576>

Zigo, F., Farkasová, Z., Vyrostková, J., Regecová, I., Ondrasovicová, S., Vargová, M., Sasáková, N., Pecka-Kielb, E., Bursová, S., & Kiss, D. S. (2022). Dairy Cows' Udder Pathogens and Occurrence of Virulence Factors in *Staphylococci*. *Animals*, 12(4), 470. <https://doi.org/10.3390/ANI12040470/S1>

2. CAPÍTULO 1:

***Staphylococcus warneri*: relação nas alterações da microbiota e dos elementos químicos do leite em caprinos**

Jéssica Lobo Albuquerque Caldeira¹ Richard Costa Polveiro¹ Juliana Miwa Fujikura¹ Luisa Maria de Souza Menezes¹ Wagner Faria Barbosa² Maria Aparecida Scatamburlo Moreira^{1*}

¹ Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

² Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

* Corresponding author:

Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, avenida PH Rolfs, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.
masm@ufv.br

RESUMO

A mastite, comum em animais leiteiros, apresenta uma associação frequente com infecções intramamárias (IMI), sendo o gênero *Staphylococcus* frequentemente identificado como agente causador em caprinos. A disbiose, desequilíbrio microbiano, é reconhecida como precursora da mastite, indicando que IMIs não são resultado isolado de um patógeno, mas desencadeiam alterações na microbiota local. Além disso, minerais desempenham papel crucial na saúde do úbere. Este estudo busca investigar as alterações nos elementos químicos presente no leite e na microbiota após infecção experimental por *S. warneri* e buscar uma correlação entre essas mudanças. Foram trabalhadas com 112 amostras de leite oriundas de sete cabras Parda Alpina, sendo que em seis animais, um lado do úbere foi infectado com *S. warneri*. Um animal foi inoculado apenas com solução salina estéril e serviu como controle negativo. Utilizou-se PCR em tempo real para detecção de patógenos e utilizamos a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) como parâmetros de infecção. Elementos químicos foram analisados via Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplada ao MEV. Os resultados mostraram que o cloro teve um aumento no lado infectado no segundo dia pós infecção, o cálcio apresentou-se maior no lado infectado no primeiro dia e decaindo no terceiro dia, o ferro foi maior no lado não infectado no quinto dia e o cobre apresentou-se maior no lado infectado no sétimo dia. Houve maior variabilidade de patógenos nos animais infectados ao longo do desenvolvimento da infecção experimental, mostrando uma possível disbiose e algumas correlações entre esses achados e os elementos químicos conseguiram ser traçadas, sendo um trabalho inédito nesse quesito. Tais correlações sugerem uma dinâmica complexa durante infecções mamárias caprinas, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da interação hospedeiro-patógeno.

Palavras-chave: Mastite. Disbiose. Leite. Caprinos.

2.1. INTRODUÇÃO

A mastite, inflamação da glândula mamária, é uma preocupação comum na criação de animais leiteiros incluindo os pequenos ruminantes. Em muitos casos, essa condição está associada a infecções intramamárias (IMI), com o gênero *Staphylococcus* identificado frequentemente como o agente causador em caprinos. Dentro desse gênero, o *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) destaca-se como o grupo de patógenos mais prevalente, desempenhando um papel significativo no desenvolvimento de mastite subclínica em animais de produção (Gocmen et al., 2019; Novac e Andrei, 2020).

A quebra do equilíbrio microbiano, conhecida como disbiose, resulta na participação da microbiota residente, composta por bactérias comensais e patogênicas, no desencadeamento da mastite (Fragkou et al., 2007; Castro et al., 2019). Estudos recentes sugerem que a IMI não é necessariamente causada por um único patógeno, mas pode servir como um desencadeador de alterações na microbiota local, desencadeando o desenvolvimento da mastite (Contreras e Rodríguez, 2011; Polveiro et al., 2020).

É amplamente conhecido que o leite cru não é estéril, e diversas bactérias podem ser detectadas em amostras de leite caprino não processado. Entre as bactérias identificadas no leite cru caprino, incluem-se *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* spp., e *Staphylococcus* spp., abrangendo diversas espécies como *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* e *S. equorum* (Foschino et al., 2002; Pisano et al., 2019). Além disso, estudos metagenômicos da microbiota do leite caprino também demonstram a diversidade de micro-organismos ali encontrado (Polveiro et al., 2020). Essas descobertas destacam que o ambiente da glândula mamária é naturalmente colonizado por micro-organismos, o que pode resultar em alterações na composição do leite quando a presença de patógenos desencadeia disfunções na glândula mamária.

Os minerais são nutrientes fundamentais que desempenham papéis cruciais na formação dos componentes estruturais do corpo e na regulação de enzimas, hormônios, vitaminas e células (Libera et al., 2021) que influenciam de igual modo o estado de saúde do úbere. A composição química do leite, incluindo o conteúdo de microelementos como ferro, cobre, e zinco, por exemplo, é

influenciada por uma série de fatores, como ambientais, genéticos e fisiológicos (Dankow e Pikul, 2011; Rolinec et al., 2018). Essa composição pode ser afetada pela presença da mastite, o que acrescenta complexidade à relação entre a saúde do úbere e a qualidade do leite (Zubeir et al., 2005)

Pesquisas em bovinos leiteiros sugerem uma relação entre a saúde do úbere e a presença de minerais no leite e no soro (Wagner e Stull, 1978; Buriana et al., 1981; El Zubei et al., 2005; Ogola et al., 2007).

Alterações nas concentrações plasmáticas de Cu, Zn e Fe foram documentadas em modelos experimentais de mastite bovina por coliformes (Erskine & Bartlett, 1993; Lohuis et al., 1990) e *Staphylococcus aureus* (Middleton et al., 2004) que demonstraram um declínio de Zn e Fe após inoculação intramamária. Esses autores chamam a atenção para a importância de certos minerais para respostas fisiológicas a invasões de patógenos.

Em um estudo conduzido por Sramek et al. (2018), utilizando amostras de leite caprino e separando as amostras com base na contagem de células somáticas, também observaram diferenças nas concentrações de minerais em diferentes grupos de animais. No entanto, há pouquíssimos estudos que relatam essa alteração de composição mineral no leite caprino e como isso é relacionado à infecção mamária.

Portanto, fica evidente que a saúde da glândula mamária pode influenciar as alterações na composição do leite e até mesmo a microbiota residente se fazendo necessário o conhecimento mais profundo dessas relações. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar as alterações decorrentes de infecção experimental por *S. warneri* em treze elementos químicos e o impacto na microbiota, bem como explorar possíveis correlações entre essas mudanças presente no leite caprino.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o registro 62/2018.

2.2.1. Amostras

Sete cabras fêmeas saudáveis da raça Parda Alpina, com proximidade genealógica, foram selecionadas da unidade de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa. Todas eram primíparas, lactantes e não haviam sido tratadas com antibióticos ou medicamentos influentes. Após avaliação clínica quanto a sinais de mastite e anormalidades no leite, foram alojadas em baias individuais higienizadas diariamente, com medidas de biossegurança, incluindo pedilúvios com cal virgem para descontaminação e áreas separadas para higienização.

Durante as duas semanas de adaptação, foram submetidas a três lactoculturas negativas para IMI antes da inoculação.

Em seis animais, um dos lados do úbere (direito) foi inoculado com uma dose de $1,2 \times 10^8$ UFC/ml do isolado de *S. warneri*, administrado por via intramamária no volume de 2 ml, conforme descrito por Moraes Peixoto et al. (2015). O isolado foi previamente obtido a partir de um caso de mastite caprina subclínica persistente identificada anteriormente por testes microbiológicos e moleculares (França, 2021 - Dados não publicados). Uma cabra controle negativo foi inoculada com 2 ml de solução salina estéril no lado direito do úbere, submetida a mesma coleta dos outros animais e serviu como referência nas análises. Durante todo o período de infecção, amostras de leite eram submetidas a placas de ágar sangue e ágar cromogênico Accumast® para acompanhamento microbiológico.

As coletas de amostras de leite para as análises foram realizadas em duplicata em tubos de centrifugação de 50ml estéril durante a ordenha manual, realizando pré e pós-dipping além assepsia com álcool 70% nos úberes manipulados, e prontamente levadas ao laboratório para alíquotar e dar destino adequado.

Todas as 112 amostras de leite, que compreendem o dia 0 (antes da infecção) e os sete dias subsequentes (Figura 1), foram analisadas para a Contagem de Células Somáticas, a Contagem Bacteriana Total, PCR em tempo real e a avaliação dos elementos químicos presentes, a fim de fornecer uma visão abrangente da infecção.

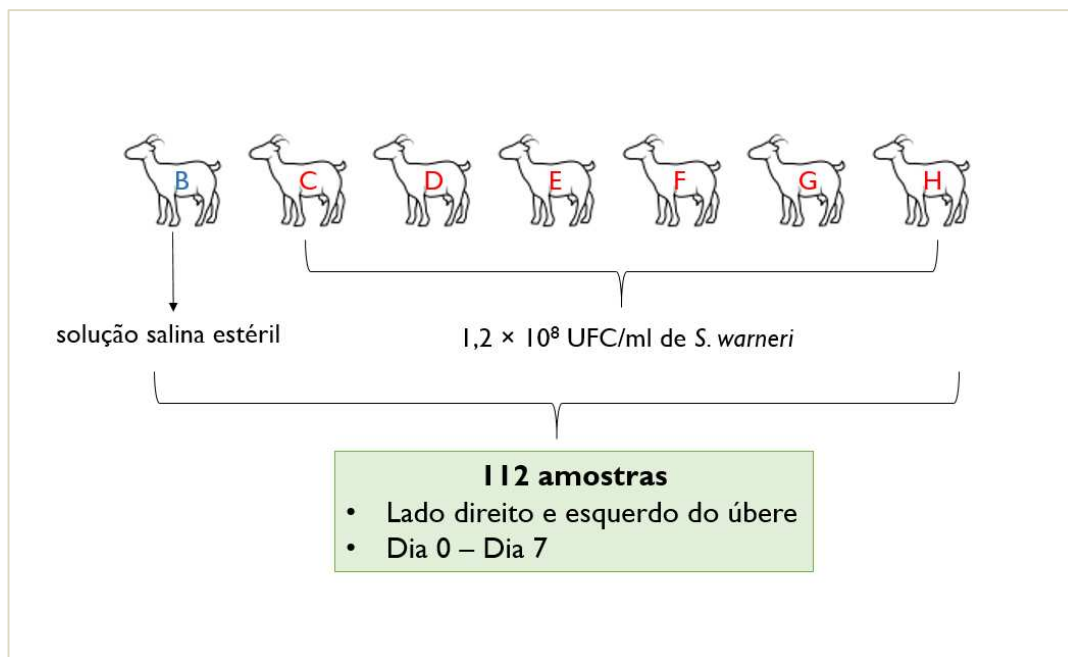


Figura 1. Esquema da distribuição de amostras ao longo do estudo. O Animal B, designado como controle negativo, recebeu inoculação de solução salina estéril no lado direito do úbere. Os Animais C a H foram infectados no lado direito com $1,2 \times 10^8$ UFC/ml de *Staphylococcus warneri*. As amostras foram coletadas tanto do lado infectado (direito) quanto do não infectado, um dia antes da infecção e nos sete dias seguintes, totalizando 112 amostras.

2.2.2. Extração de DNA e PCR em tempo real

Foi utilizado um kit comercial de PCR em tempo real multiplex, específico para extração em leite e detecção de agentes causadores de mastite (VETMAX MASTITYPE MULTI COMBO K TOPFILL - Thermo Fisher Scientific) para analisar todas as amostras de leite. O protocolo do kit compreende quatro reações de PCR em tempo real multiplex distintas, que visam 15 espécies e grupos bacterianos diferentes: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. (incluindo todas as espécies relevantes do SCN), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. (incluindo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*), *Klebsiella oxytoca* (e/ou *K. pneumoniae*), *Corynebacterium bovis*, *Serratia marcescens*, *Trueperella pyogenes* (e/ou *Peptoniphilus indolicus*), *Staphylococcal β -lactamase* (resistente à penicilina), *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* spp., leveduras e *Prototheca* spp.

O teste foi conduzido conforme as instruções fornecidas no manual do usuário. Com base nos valores de limiar do ciclo (Ct) obtidos, a quantidade de DNA bacteriano em relação a cada espécie bacteriana alvo foi categorizada em três classes: pequena quantidade (1), quantidade intermediária (2) ou grande quantidade (3), de acordo com as diretrizes do fabricante.

Embora esse kit não seja específico para *S. warneri*, há uma abrangência para *Staphylococcus* spp. sendo sua utilização importante para monitorar a composição microbiana e os potenciais disbioses que podem ocorrer na glândula mamária durante infecção por *S. warneri*.

2.2.3. Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total

Para monitorarmos a infecção experimental, as amostras foram submetidas a análise de CCS e CBT, servindo como indicadores de potencial mastite e multiplicação bacteriana. Além disso, correlações entre a presença de patógenos e esses parâmetros foram testados.

As amostras de leite foram acondicionadas em dois frascos contendo conservantes específicos em cada, incluindo o Bronopol® e comprimidos de Azidiol. A análise da CCS do leite foi conduzida utilizando o método de citometria de fluxo, empregando o equipamento eletrônico Bentley Instruments, modelo NexGen Somacount FCM Bentley FTS. A CBT foi determinada com o auxílio do equipamento eletrônico Bentley Instruments, modelo Bactcount IBC, todos realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, Brasil.

2.2.4. Elementos Químicos

Amostras de leite, acondicionadas em microtubos, foram submetidas ao liofilizador ®Edwards Modulyo freeze dryer sob uma temperatura de -40°C e 4 atm por 36 horas. Com a amostra seca, foi realizada a maceração da amostra e acondicionamento em -80°C. Posteriormente, a amostra liofilizada era posicionada em stubs contendo fita adesiva dupla face de carbono. Esses stubs foram transferidos para um dessecador contendo sílica gel, onde permaneceram por aproximadamente quatro dias, assegurando um ambiente de preparação ideal. Após esse período as amostras foram encaminhadas ao Núcleo de Microscopia e Microanálises, UFV para os processos subsequentes.

Estudos anteriores relacionaram elementos como Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Fe e Zn à mastite e à saúde do úbere (El Zubeir et al., 2005; Spain et al., 2005; Kandeel et al., 2019). No entanto, buscando ampliar essa compreensão, investigamos outros elementos em nossa pesquisa. Assim, foi realizada a avaliação da distribuição de treze elementos químicos sendo eles, Carbono (C), Nitrogênio (N), Oxigênio (O), Cálcio (Ca), Sódio (Na), Potássio (K), Cobre (Cu), Magnésio (Mg), Zinco (Zn), Fósforo (P), Cloro (Cl), Ferro (Fe) e Molebdênio (Mo), através de energia dispersiva (EDS) acoplada ao MEV, preparados com metalização por ouro utilizando o Metalizador Quorum Q150R S.

2.2.5. Análise estatística

Na análise estatística, os dados foram processados utilizando o software R (R Core Team, 2022), com pacotes especializados para atender às demandas de cada avaliação específica. Utilizamos heatmaps, gerados pelo pacote *ggplot2*, para visualizar contagens e intensidades de bactérias no leite, classificando a presença bacteriana em variáveis dicotômicas: "1" para presença e "0" para ausência. Posteriormente, conduzimos correlações ponto-bisserial com outras métricas, como componentes do leite e contagens bacterianas, utilizando testes *t* e visualizando os resultados através de gráficos gerados pelo *ggplot2* (Wickham, 2016).

Para analisar elementos químicos do leite, empregamos modelos lineares de efeitos mistos, aplicando a função *lme()* do pacote "nlme" (Pinheiro et al., 2023; Pinheiro & Bates, 2006). O foco principal foi maximizar a sensibilidade estatística para identificar variações sutis entre úberes tratados e não tratados. Incorporamos splines de regressão nos modelos, permitindo a interação com o efeito do úbere e considerando efeitos aleatórios para a origem animal, garantindo ajustes para medições repetidas (Fitzmaurice et al., 2012; Bojanowski, 2023).

A seleção do modelo foi orientada pela minimização do Root Mean Square Error (RMSE) e do Bayesian Information Criterion (BIC). Após a escolha dos modelos, calculamos médias marginais estimadas e realizamos comparações usando os pacotes "emmeans" (Lenth, 2023) e "multcomp" (Hothorn et al., 2008). As visualizações finais foram geradas pelo *ggplot2*, destacando tratamentos de referência para uma interpretação clara dos resultados obtidos.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. PCR em tempo Real

Os resultados da análise de PCR em tempo real em amostras de leite caprino submetido a infecção experimental por *S. warneri* revelaram a presença de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite desde o dia 0, antes da inoculação com *S. warneri*, na maioria dos animais (Fig. 2). Essa presença aumentou gradualmente, atingindo 100% nos dias 3 e 4 após a inoculação, sugerindo que a infecção por *S. warneri* favoreceu uma maior colonização da glândula mamária caprina por *Staphylococcus* spp.

Os resultados também indicaram uma variabilidade genética nos micro-organismos presentes tanto lado direito do úbere quanto no lado esquerdo dos animais ao longo do desenvolvimento da infecção (Fig.2). Isso infere a possibilidade de que a infecção por *S. warneri* possa contribuir para um aumento na disbiose na glândula mamária caprina, ou seja, uma alteração no equilíbrio da microbiota em ambos os lados do úbere.

No animal controle negativo, observou-se a presença de *Staphylococcus* spp. na maioria dos dias do estudo além do gene β -lactamase, acompanhada ocasionalmente por outros micro-organismos, como, *E. coli*, *Enterococcus* spp., *S. aureus* e *Mycoplasma* spp., ao longo do período de análise. Isso pode sugerir a presença de uma microbiota normal variável no leite caprino, embora seja importante ressaltar que essa conclusão é baseada principalmente em observações, uma vez que apenas um animal foi utilizado como controle negativo, limitando a possibilidade de inferências causais servindo então apenas como um referencial.

Notou-se que a intensidade da presença gênica dos micro-organismos, avaliada em uma escala de 0 (ausência) a 3 (grande quantidade), foi maior nos animais infectados em comparação com o animal não infectados (Fig. 3). Especificamente, *Staphylococcus* spp e o gene β -lactamase aumentaram gradualmente a partir do dia 1 da inoculação experimental nos animais infectados. Esses achados indicam que a infecção por *S. warneri* teve um impacto significativo na microbiota da glândula mamária caprina inclusive com a expressão de genes associados à resistência antimicrobiana.

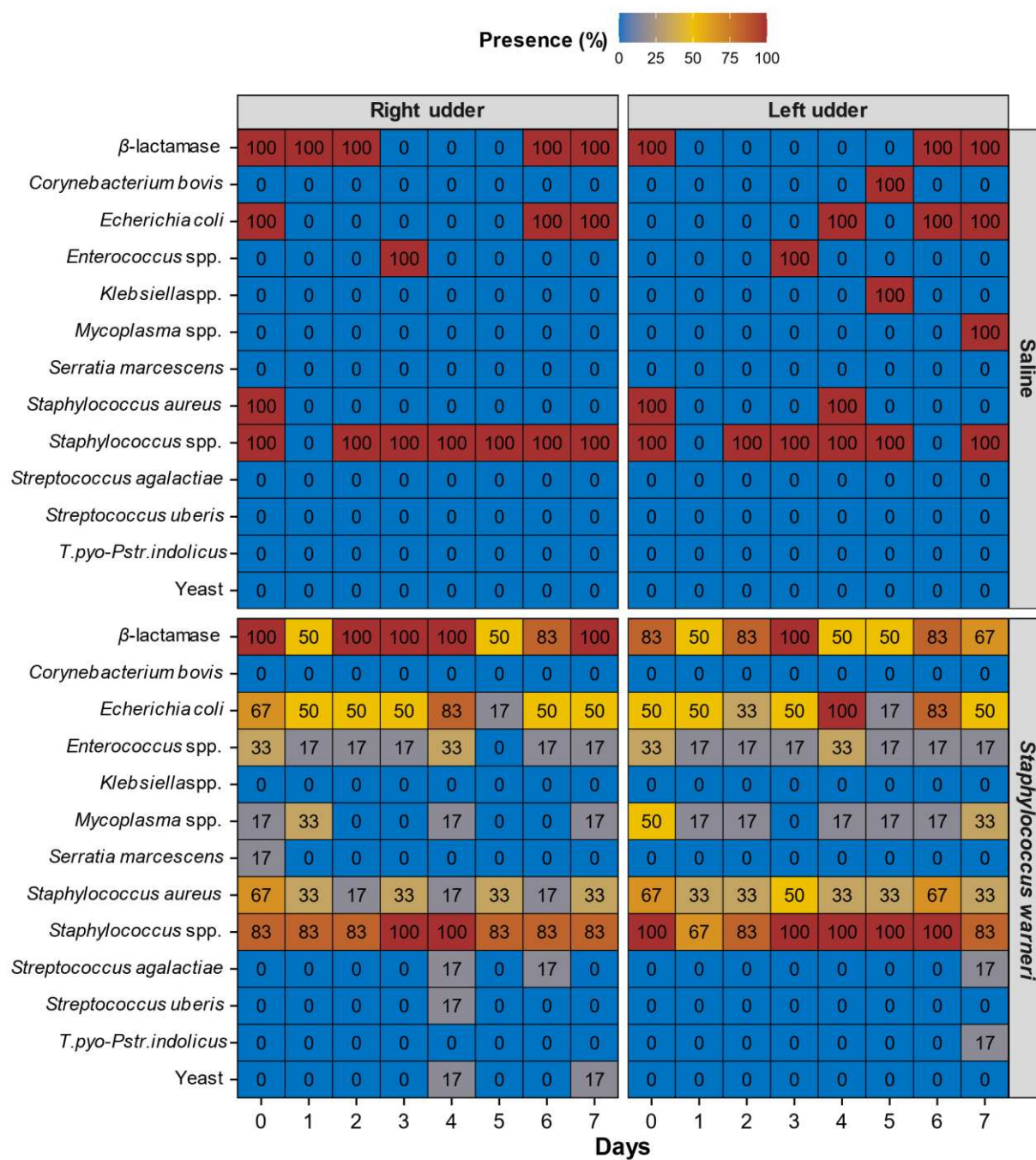


Figura 2. Porcentagem temporal (%) da presença de genes bacterianos no leite oriundo de úberes distintos (direito e esquerdo) em cabras após a inoculação com *Staphylococcus warneri* ou solução salina.

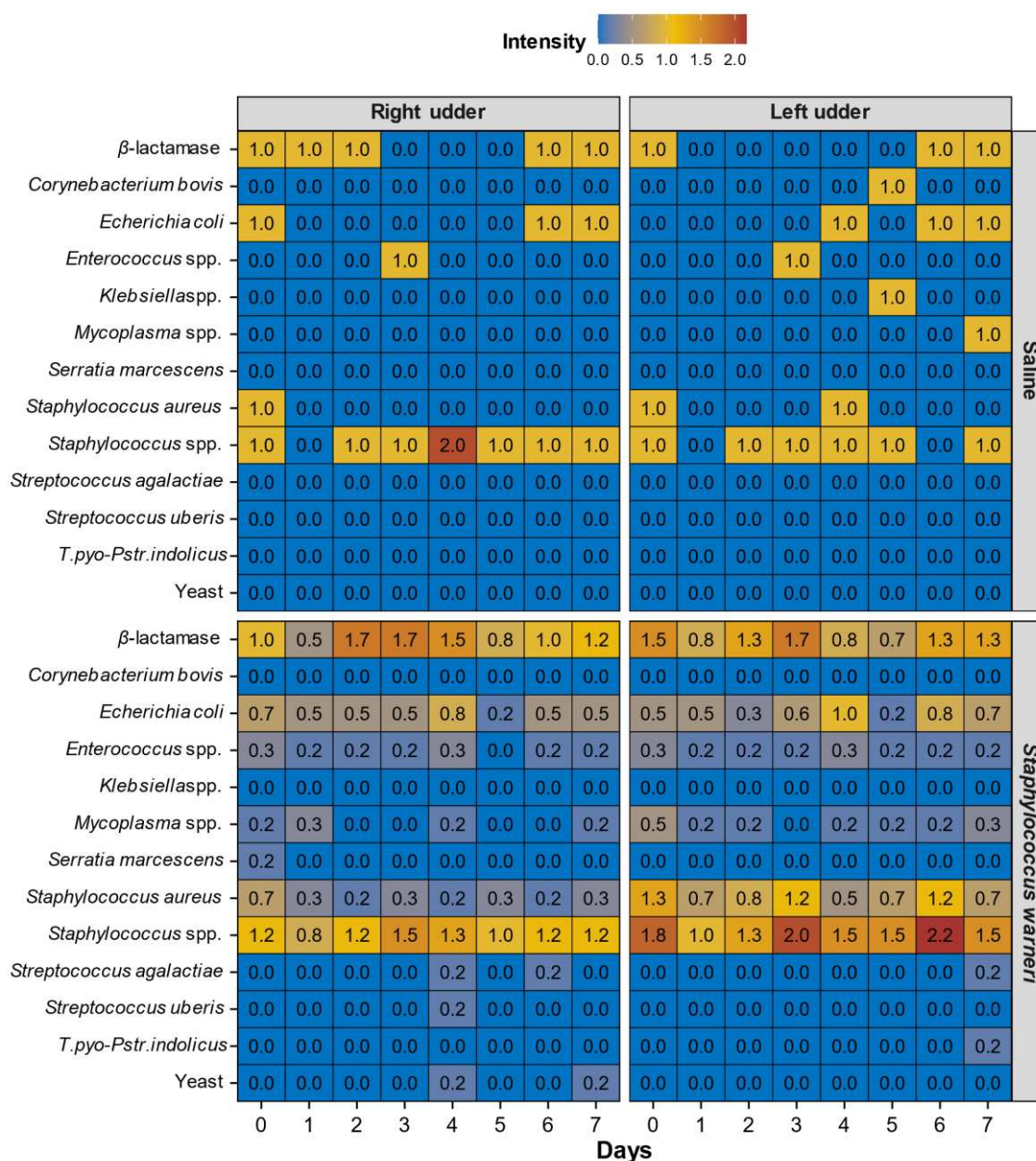


Figura 3. Intensidade temporal (com número médio da intensidade detectada no PCR em tempo real) da presença de genes bacterianos no leite oriundos de úberes distintos (direito e esquerdo) em cabras após a inoculação com *Staphylococcus warneri* ou solução salina.

Na Figura 4, é possível observar a contagem individual dos patógenos identificados em cada animal ao longo do período analisado. No contexto desta análise, destacamos o animal B, que desempenhou o papel de controle negativo, e os animais C a H, que foram inoculados com *S. warneri* no lado direito do úbere. Esta representação tem como objetivo fornecer um panorama individual abrangente, uma vez que não podemos negligenciar as características individuais de cada animal.

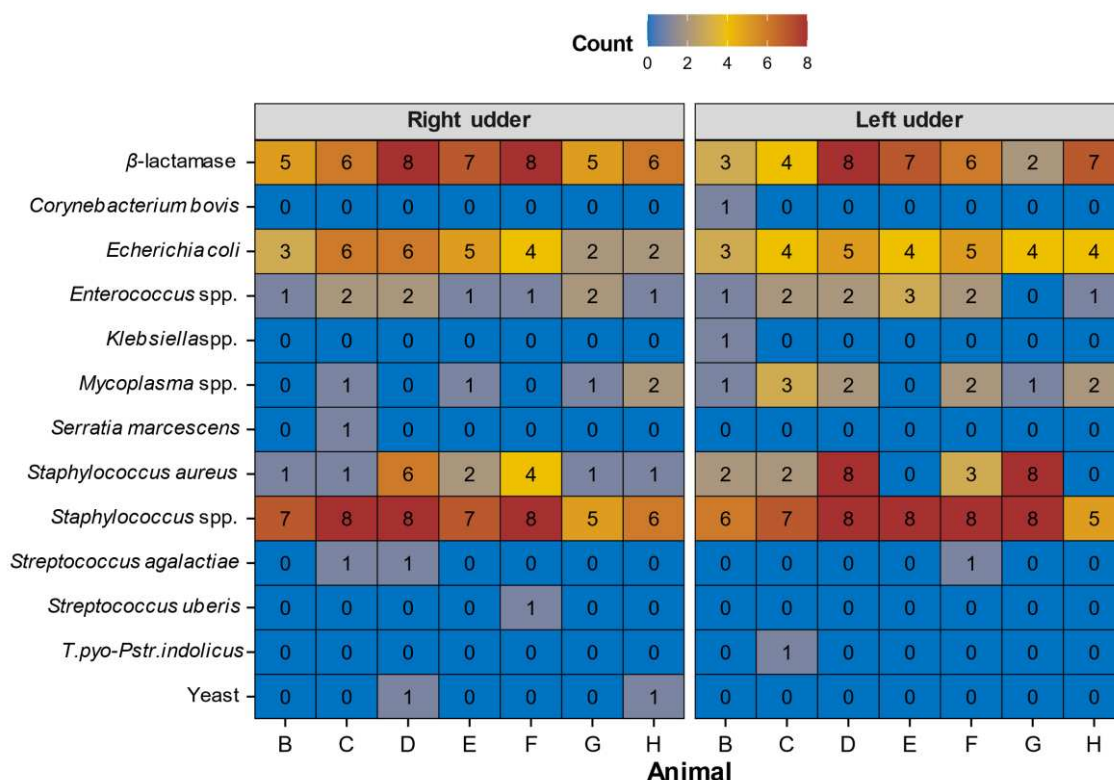


Figura 4. Contagem temporal acumulada em diferentes animais exibindo presença de genes de micro-organismos no leite oriundos do lado direito e esquerdo do úbere de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri*. O animal B recebeu solução salina.

2.3.2. CCS, CBT e correlação com presença de micro-organismos

As tabelas 1 e 2 demonstram a variação ao longo do tempo das contagens de célula somática e a contagem bacteriana total. Ressaltamos os dias 2 a 4 após a inoculação que possuem diferenças estatísticas significativas entre os grupos, em que o grupo inoculado tem um aumento expressivo nesses parâmetros demonstrando que houve uma indução de resposta celular pela inoculação experimental.

Tabela 1. Contagem de Células Somáticas (CCS) ao longo do tempo em animais inoculados experimentalmente com *Staphylococcus warneri*.

Tratamento	Tempo (dias)				
	0	2	4	5	7
Controle	571624 ± 788567 a	571624 ± 788540 b	571625 ± 788529 b	571625 ± 788529 b	571626 ± 788541 b
Inoculado	1240579 ± 1110684 a	9746450 ± 895066 a	3683105 ± 861165 a	3310432 ± 868888 a	3067765 ± 907620 a

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo método sidak (P <0,05)

Tabela 2. Contagem Bacteriana Total (CBT) ao longo do tempo em animais inoculados experimentalmente com *Staphylococcus warneri*.

Tratamento	Tempo (dias)				
	0	2	4	5	7
Controle	21800 ± 200233 a	21800 ± 200231 b	21800 ± 200231 b	21800 ± 200231 a	21800 ± 200233 a
Inoculado	87468 ± 257839 a	3491131 ± 254331 a	1010960 ± 245149 a	396216 ± 247248 a	467359 ± 257716 a

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo método sidak (P <0,05)

A Figura 5 busca estabelecer uma possível correlação entre os patógenos identificados no lado infectado do úbere e seu impacto na contagem bacteriana total e na contagem de células somáticas. Notou-se uma correlação positiva entre a presença do gene β -lactamase, *E. coli* e *Enterococcus* spp. e o aumento da contagem bacteriana total e da contagem de células somáticas. No entanto, os demais patógenos, inclusive *Staphylococcus* spp, demonstraram uma correlação negativa. Observa-se que no animal controle negativo, a presença dos patógenos identificados não parece exercer uma influência significativa sobre esses parâmetros, com exceção da *E. coli*, que apresentou correlação positiva com a contagem de células somáticas. Isso pode sugerir que os patógenos identificados podem fazer parte da microbiota normal presente no úbere, não gerando nenhum dano apenas por sua presença.

Observou-se diferença significativa por meio do teste *t* apenas para a correlação negativa entre o gene β -lactamase e a Contagem Bacteriana Total.

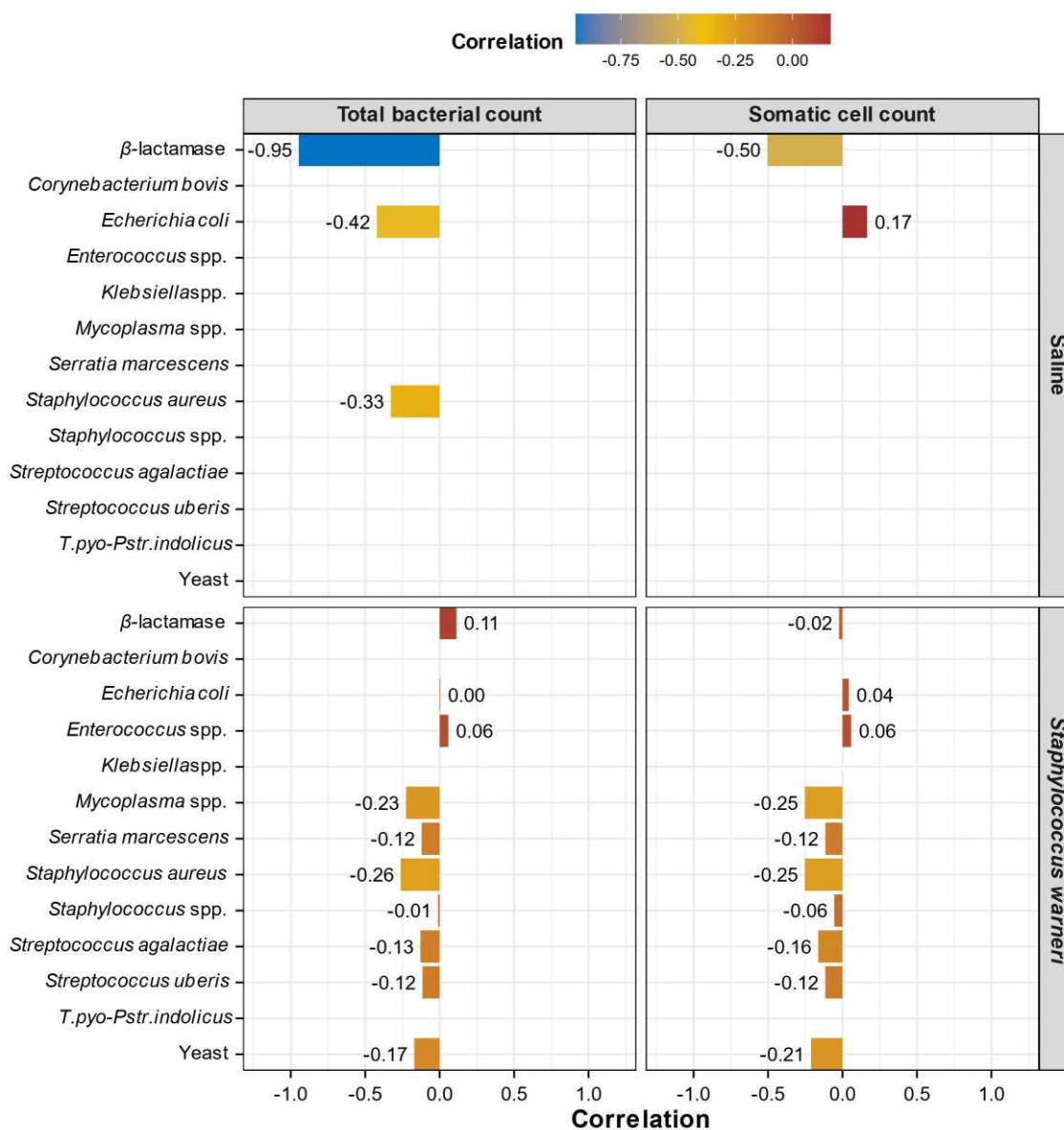


Figura 5. Correlação ponto-biserial entre bactérias e Contagem bacteriana total ou células somáticas presentes no leite oriundos do úbere direito de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* ou tratadas com tampão salino. A estimativa de correlação leva em consideração os tratamentos. As barras de ausência representam correlação indeterminada devido à uniformidade de valores em pelo menos uma das variáveis utilizadas na estimativa. Apenas a correlação entre β -lactamase e contagem bacteriana total no animal com solução salina foi significativa pelo teste *t* ($P < 0,05$).

2.3.3. Elementos químicos e correlação com a presença de micro-organismos

Dos 13 elementos examinados, apenas quatro (Cl, Ca, Fe e Cu) apresentaram variações estatisticamente significativa ao longo do tempo entre os lados direito e esquerdo do úbere das cabras, conforme indicado nas Figuras 6-8 e Tabelas Suplementares S1 e S2.

O cloro apresentou concentrações mais elevadas no lado direito do úbere ($2,92 \pm 0,22$ SE) em comparação ao lado esquerdo ($2,19 \pm 0,22$ SE) no segundo dia de avaliação. Já o cálcio mostrou variações com concentrações superiores no lado direito no primeiro dia ($2,27 \pm 0,10$), mas invertendo no terceiro dia com o lado direito ($1,64 \pm 0,10$ SE) menor que o esquerdo ($2,04 \pm 0,09$ SE). Além disso, o ferro mostrou uma concentração mais alta no lado esquerdo no quinto dia ($0,09 \pm 0,01$), e o cobre foi predominantemente mais elevado no lado direito no sétimo dia de avaliação ($0,41 \pm 0,07$ SE) no sétimo dia de avaliação. Esses dados demonstram uma variação dinâmica dos elementos no decorrer da infecção.

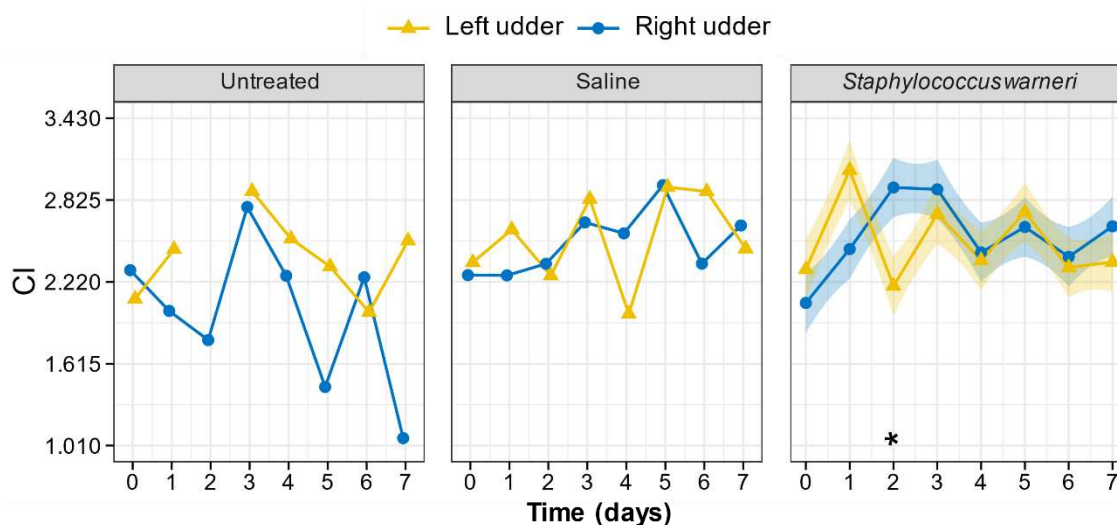


Figura 6. Variação temporal do teor de cloro (Cl) no leite oriundos de cada lado do úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* no lado direito. Os dados de um único animal para ambos os lados do úbere são apresentados nas seções esquerda e central da imagem, representando a condição sem inoculação (Não tratado) e a condição em que o animal recebeu inoculação de solução salina estéril (Salina). No lado direito do gráfico estão representadas as médias estimadas dos dados (pontos do círculo) e do modelo (linhas) com seus desvios padrão (área sombreada) da quantidade do elemento ao longo do tempo para os animais que foram inoculados com o *S. warneri*. *representa contraste significativo com significância de 5%.

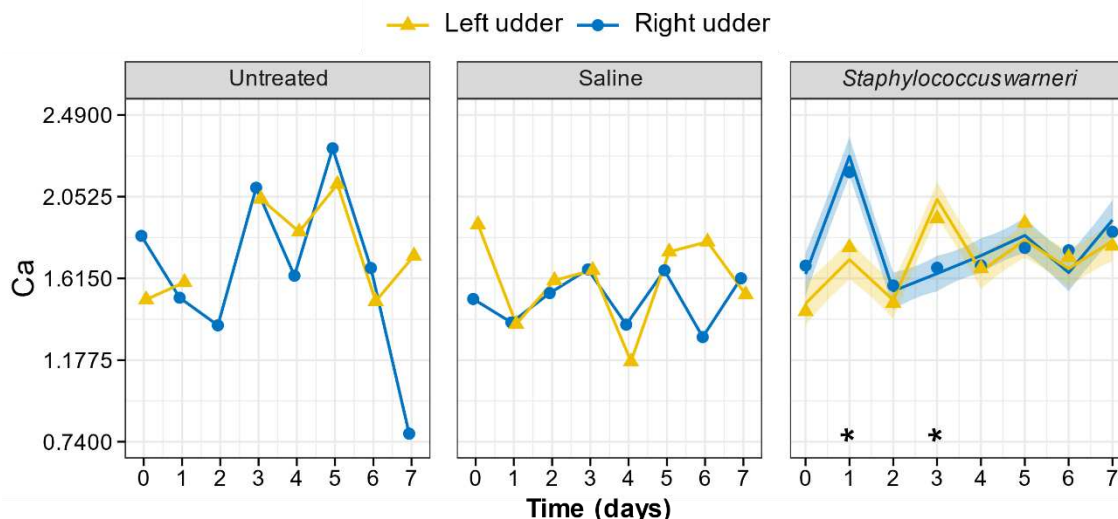


Figura 7. Variação temporal do teor de cálcio (Ca) no leite oriundos de cada lado do úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* no lado direito. Os dados de um único animal para ambos os lados do úbere são apresentados nas seções esquerda e central da imagem, representando a condição sem inoculação (Não tratado) e a condição em que o animal recebeu inoculação de solução salina estéril (Salina). No lado direito do gráfico estão representadas as médias estimadas dos dados (pontos do círculo) e do modelo (linhas) com seus desvios padrão (área sombreada) da quantidade do elemento ao longo do tempo para os animais que foram inoculados com o *S. warneri*. *representa contraste significativo com significância de 5%.

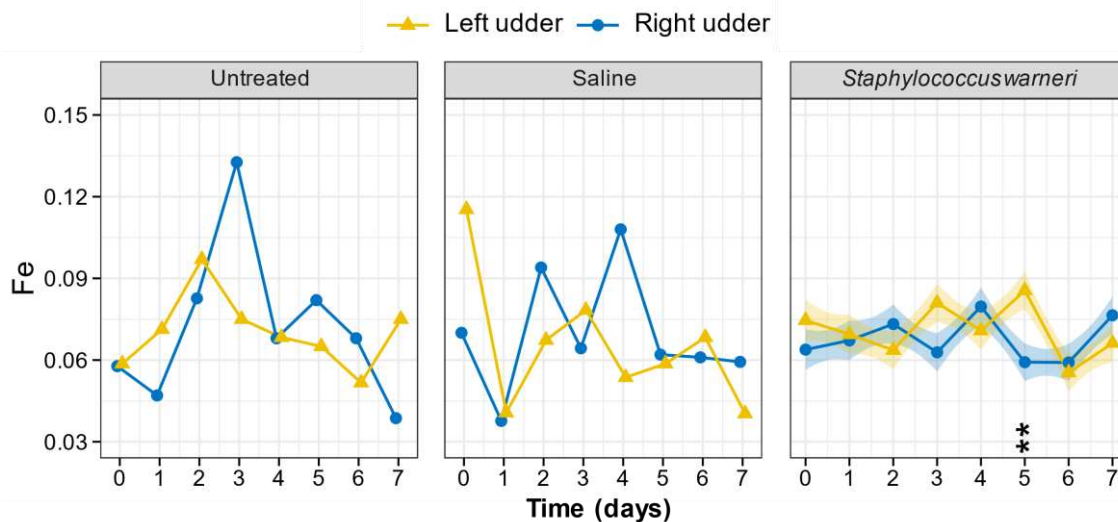


Figura 8. Variação temporal do teor de ferro (Fe) no leite oriundos de cada úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* no lado direito do úbere. Os dados de um único animal para ambos os úberes são apresentados nas seções esquerda e central da imagem, representando a condição sem inoculação (Não tratado) e a condição em que o animal recebeu inoculação de solução salina estéril (Salina). No lado direito do gráfico estão representadas as médias estimadas dos dados (pontos do círculo) e do modelo (linhas) com seus desvios padrão (área sombreada) da quantidade do elemento ao longo do tempo para os

animais que foram inoculados com *S. warneri*. **representa contraste significativo com significância de 1%.

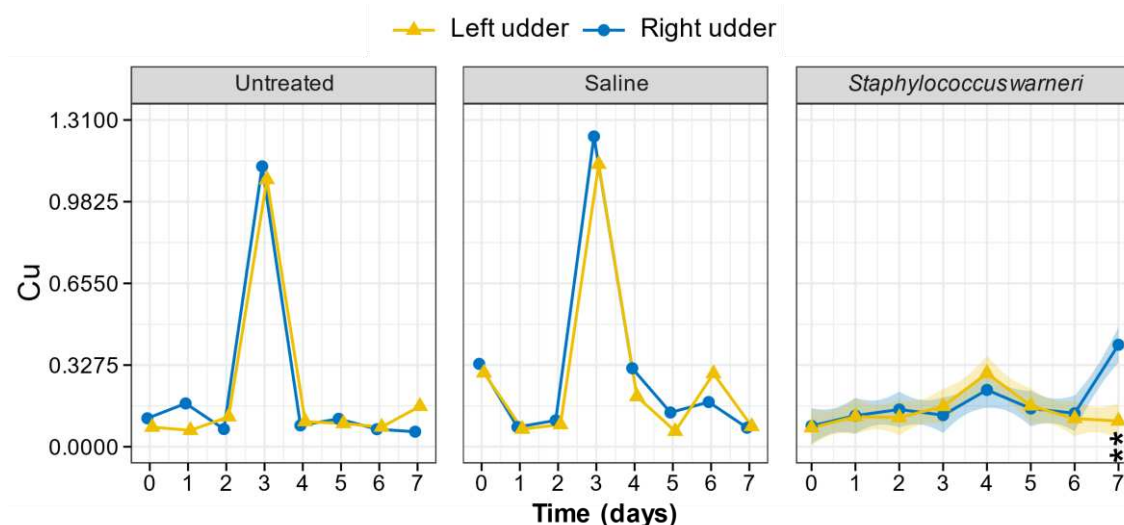


Figura 9. Variação temporal do teor de cobre (Cu) no leite oriundos de cada úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* no úbere direito. Os dados de um único animal para ambos os úberes são apresentados nas seções esquerda e central da imagem, representando a condição sem inoculação (Não tratado) e a condição em que o animal recebeu inoculação de solução salina estéril (Salina). No lado direito do gráfico estão representadas as médias estimadas dos dados (pontos do círculo) e do modelo (linhas) com seus desvios padrão (área sombreada) da quantidade do elemento ao longo do tempo para os animais que foram inoculados com *S. warneri*. **representa contraste significativo com significância de 1%.

A Figura 10 apresenta um heatmap que destaca correlações entre a presença de patógenos e a concentração de elementos químicos nas amostras de leite de cabras de ambos os lados do úbere, a fim de encontrar alguma informação relevante sobre a disbiose provocada e a composição do leite.

Com significância estatística observa-se que a presença do gene de *Corynebacterium bovis* está correlacionada com a concentração de nitrogênio, enquanto a presença de *E. coli* apresenta correlações com os níveis de ferro e nitrogênio. Além disso, a presença de *Serratia marcescens* demonstra correlações com os elementos químicos carbono, cálcio, potássio, oxigênio e fósforo, enquanto *Staphylococcus aureus* está associado a níveis de cloro e sódio.

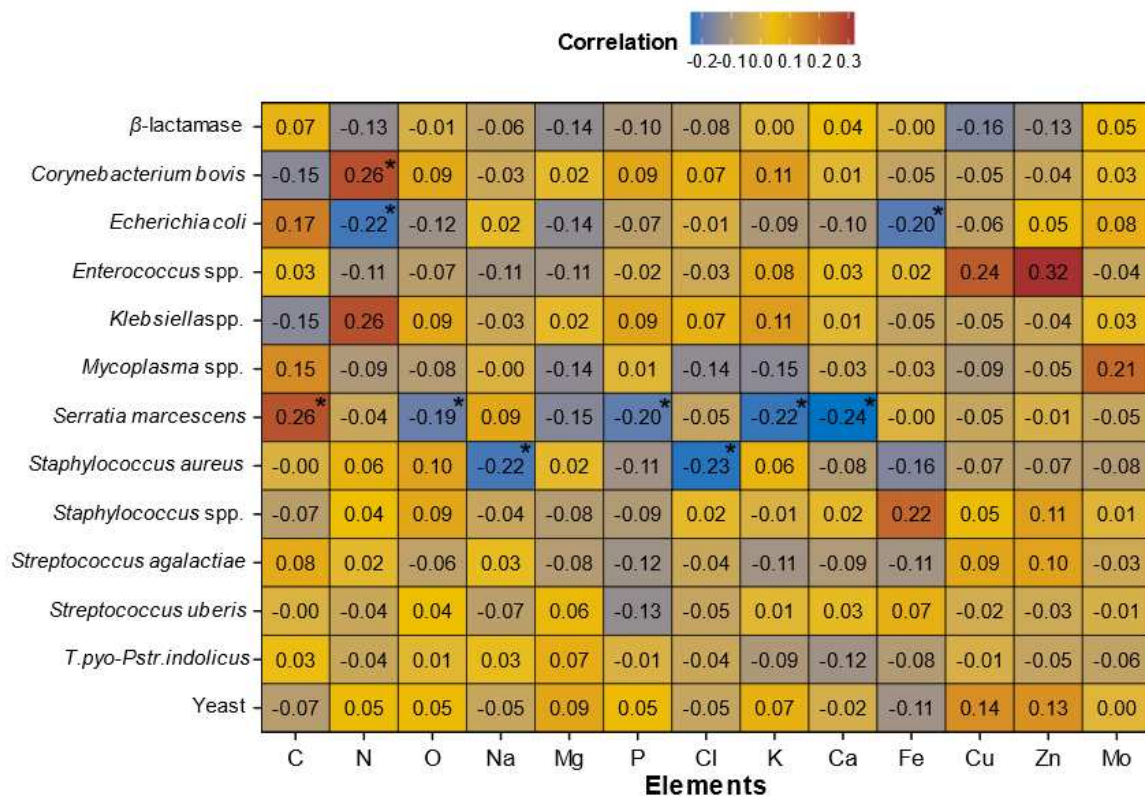


Figura 10. Correlação ponto-bisserial entre bactérias e elementos presentes no leite oriundos de cada lado do úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* ou tratadas com solução salina. A estimativa da correlação não levou em consideração os tratamentos e a origem do leite do úbere. *As células marcadas indicam correlações significativas pelo teste t ($P < 0,05$).

A Figura 11 apresenta um heatmap com informações relevantes considerando tanto o grupo de animais controle como os animais infectados.

No lado direito do úbere do animal controle, identificamos as seguintes correlações significativas: o gene beta-lactamase demonstrou associações com os elementos químicos cloro e potássio, enquanto a presença de *Enterococcus* spp. correlacionou-se com os níveis de cobre e zinco. No lado esquerdo do úbere do animal controle, observamos correlações de *Corynebacterium bovis* com os elementos químicos carbono, nitrogênio e fósforo, bem como a presença de *Enterococcus* spp. com cobre e zinco. Além disso, *Klebsiella* spp. correlacionou-se com carbono, nitrogênio e oxigênio, e *Mycoplasma* spp. com molibdênio.

No grupo de animais infectados, no lado direito do úbere, foram identificadas as seguintes correlações significativas: a presença do gene β -lactamase apresentou associação com os elementos químicos nitrogênio e fósforo, enquanto a presença de *E. coli* correlacionou-se com os níveis de magnésio e nitrogênio. *Enterococcus* spp. demonstrou associação com zinco, *Mycoplasma* spp. com cálcio e fósforo, *Serratia* spp. com carbono, cálcio, potássio, molibdênio e fósforo, *S. aureus* com cloro e ferro, *Staphylococcus* spp. com magnésio e molibdênio, e *Streptococcus agalactiae* com ferro.

No lado esquerdo do úbere, que é o lado não infectado, a presença de *Mycoplasma* spp correlacionou-se com cálcio e potássio, *Staphylococcus* spp. com sódio e oxigênio, e *T. pyogenes* com molibdênio. Essas correlações fornecem *insights* valiosos sobre as interações entre os patógenos e a composição química do leite nos diferentes contextos de infecção e controle.

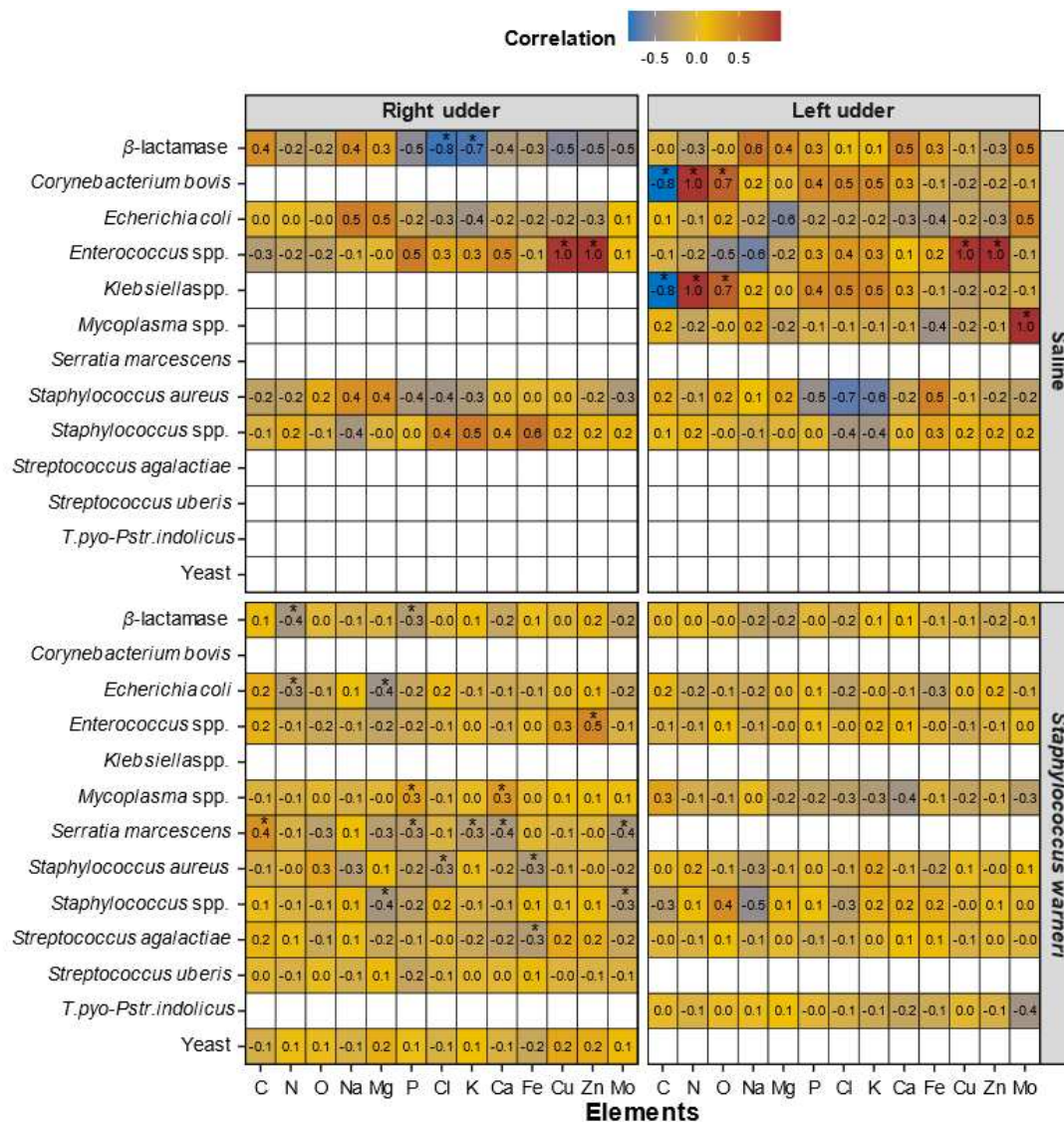


Figura 11. Correlação ponto-bisserial entre bactérias e elementos presentes no leite para cada úbere (direito e esquerdo) de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* ou tratadas com tampão salino. A estimativa da correlação leva em consideração os tratamentos e a origem do leite do úbere. As células preenchidas em branco representam correlação indeterminada devido à uniformidade de valores em pelo menos uma das variáveis utilizadas na estimativa. *As células marcadas indicam correlações significativas pelo teste t (P <0,05).

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. Microbiota e correlação com CCS e CBT

De acordo com estudos, o gênero *Staphylococcus*, embora frequentemente associado a mastite em pequenos ruminantes (Deinhofer e Pernthaner 1994; Contreras et al., 2007; Peixoto et al., 2010) também se revela um micro-organismo relevante no microbioma do leite caprino (Tormo et al., 2011; McInnis et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2017; Polveiro et al., 2020).

No presente estudo, identificamos a presença de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite antes da inoculação experimental e em amostras do grupo de controle negativo, conforme ilustrado na Figura 2, o que corrobora com os estudos anteriores. É interessante observar que esse gênero é encontrado não apenas no microbioma do leite de caprinos, mas também em microbiomas de leite saudável de seres humanos e bovinos (Oikonomo et al., 2014; Hunt et al., 2011)

A disbiose é caracterizada pela desestabilização do equilíbrio entre micro-organismos comensais e patogênicos. Estudos envolvendo o microbioma bovino evidenciam que a perturbação na microbiota desempenha um papel na patogênese da mastite, contribuindo também para a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (RAM) por meio do leite (Oikonomou et al 2014; Oikonomou et al 2012; Addis, et al., 2016).

Em nosso estudo, ao longo do desenvolvimento da infecção experimental, identificamos diversidade significativa de micro-organismos presentes ambos os lados do úbere, conforme ilustrado na figura 2. Além disso, observamos variações na intensidade desses micro-organismos ao longo do tempo, conforme evidenciado na Figura 3. Notavelmente, na figura 3, destacam-se os picos de amplificação dos genes relacionados ao gênero *Staphylococcus* spp. e um aumento na intensidade do gene β -lactamase, principalmente nos dias 2 a 3 de infecção, que como demonstrado nas tabelas 1 e 2 são os dias de maior aumento no CCS e CBT nos animais infectados. Esses achados corroboram com estudos citados anteriormente que destacam o impacto da disbiose no contexto da mastite.

Oikonomou et al. (2014) investigaram a microbiota em bovinos leiteiros e constataram que as amostras de leite provenientes de vacas saudáveis apresentavam uma composição microbiana distinta em comparação com as amostras obtidas de animais classificados com diferentes graus de mastite. Esse achado, aliado ao fato de que membros de vários gêneros bacterianos foram identificados em todas as amostras coletadas de animais saudáveis, levou os autores a propor a existência de uma microbiota nativa na glândula mamária bovina.

Quando observamos em nosso estudo os demais animais no dia 0, que corresponde a antes da inoculação com *S. warneri* (figura 2), bem como visualizamos os animais individualmente (figura 4) encontramos a presença de diferentes bactérias, possuindo pequena variação entre os indivíduos, que nos levanta a possibilidade real de haver uma microbiota residente ali presente. Isso ocorre também com o animal controle negativo.

Estudos anteriores relacionaram algumas bactérias comumente encontradas no leite cru de caprinos, como *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Staphylococcus* spp., abrangendo espécies como *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* e *S. equorum* (Foschino et al., 2002; Pisano et al., 2019). Além disso, é conhecido que o leite cru de pequenos ruminantes é dominado por bactérias ácido lácticas (BAL), com gêneros comuns, como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Quigley et al., 2013; Perin e Nero, 2014).

Esses dados se alinham com nossos achados, uma vez que identificamos a presença de *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *S. aureus* no controle negativo e no período anterior à inoculação experimental nos demais animais. Além disso, *Mycoplasma* spp. e *Serratia* spp. também foram detectados, embora com uma ocorrência relativamente baixa de apenas 17%, como evidenciado na Figura 2.

Observa-se uma semelhança nos patógenos identificados nos lados direitos e esquerdos do úbere, tanto nos animais inoculados quanto nos não inoculados. Isso pode ser explicado pela presença de uma microbiota residente compartilhada, uma vez que os animais estão alojados no mesmo ambiente e

são submetidos ao mesmo tipo de manejo. No entanto, chama a atenção uma variabilidade mais acentuada nos animais inoculados, bem como uma maior quantidade de patógenos ao longo do tempo. Esses achados sugerem a possibilidade de que a inoculação de *S. warneri* tenha exercido influência na microbiota pré-existente da glândula mamária, contribuindo para as diferenças observadas nos patógenos identificados.

Embora consigamos demonstrar uma variação na CCS e CBT ao longo do tempo e suas diferenças entre inoculado e não inoculados (tabela 1 e 2), no que diz respeito à correlação entre a presença de patógenos e seu impacto sobre a CCS e a CBT, nossos dados, conforme apresentados na Figura 4, indicam que as correlações não são claramente definidas.

Essa observação está em consonância com estudos anteriores que também relataram resultados semelhantes, evidenciando uma controvérsia na relação entre CCS e IMI em caprinos (Smith & Roguinsky, 1977; Sheldrake et al., 1981; Paape et al., 2001). Min et al (2007) mostram que a CCS das metades de úbere saudáveis (não infectado) nem sempre foi inferior à das metades de úbere infectado.

Em outras palavras, a presença de um patógeno nem sempre implica necessariamente um aumento na contagem de células somáticas no úbere caprino, da mesma forma que um aumento na contagem de células somáticas não é exclusivamente causado por uma infecção ou pela presença de um micro-organismo, já que em cabras o aumento da CSS pode ser influenciado pela idade, raça e paridade por exemplo (Paape 1997).

2.4.2. Elementos químicos e correlação com a presença de micro-organismos

Os minerais exercem ações fundamentais na saúde do úbere. Existem dois grupos de minerais com base em suas concentrações no organismo: macrominerais, encontrados em quantidades relativamente elevadas, e minerais ou microelementos, presentes em menor quantidade. Macrominerais incluem cálcio, fósforo, sódio, cloro, enxofre e magnésio, enquanto os microelementos incluem ferro, cobre, manganês, zinco, cobalto, cromo, iodo, molibdênio e selênio (Libera et al., 2021).

Em um estudo conduzido por El Zubeir et al. (2005), que investigou amostras de leite e soro sanguíneo de vacas com mastite clínica, subclínica e saudáveis quanto aos macrominerais (sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo), observou-se diferenças significativas entre os grupos. No leite de vacas com mastite, houve um aumento de sódio e cloro, além de uma redução de potássio, resultados que coincidem com estudos anteriores em bovinos (Buriana et al, 1981; Chaiyabutr et al.1988; Smith et al.1990).

A influência de CCS nas concentrações de sódio, magnésio e cloro no leite foi estatisticamente relevante em um estudo com cabras leiteiras, onde essas concentrações foram maiores no grupo com CCS elevada (Sramek et al., 2018).

No presente estudo, observamos que o cloro apresentou uma concentração mais elevada no úbere infectado em comparação com o úbere não infectado no segundo dia de infecção (Figura 6). Além disso, o sódio também teve um aumento no segundo dia, embora não tenha atingido significância estatística (conforme demonstrado na Tabela Suplementar S2). Importante destacar que de acordo com Kandeel et al. (2019), a concentração de sódio (Na) no leite emerge como um indicador sensível da extensão da lesão tecidual em quartos mamários com mastite subclínica (SCM) ou mastite clínica em bovinos. Isso se deve ao fato de que o sódio, como eletrólito plasmático, é detectável no leite em níveis reduzidos de lesão celular.

Esses achados coincidem com estudos anteriores de Holt (1985) e Ogola et al. (2007), que indicaram concentrações mais altas de sódio e cloro, bem como concentrações mais baixas de potássio e cálcio nos úberes de vacas infectadas. O qual também podemos visualizar na tabela suplementar S2, que no mesmo dia do aumento do sódio e cloro houve um declínio do potássio. Este fato pode ser atribuído a possíveis danos às células secretoras ductais causada pela inflamação do úbere e ao aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos. Como resultado, sódio e cloro, que são predominantemente encontrados no líquido extracelular, fluem para o lúmen do alvéolo. Consequentemente, para manter a osmolaridade e os níveis de potássio diminuem proporcionalmente (Kitchen, 1981).

Em um estudo conduzido por Kandeel et al. (2019), que envolveu amostras de 115 bovinos leiteiros para avaliar a precisão da medição de

condutividade elétrica, Na, K e Ca no diagnóstico de mastite subclínica e infecções intramamárias, foi constatado que a concentração de Ca ionizado no leite diminui na presença de mastite. Essa redução pode ser resultado da diminuição na concentração total de Ca, que está associada à diminuição na síntese de caseína e, conseqüentemente, à menor concentração de caseína no leite.

Outros estudos também enfatizaram a redução do teor de cálcio em amostras de leite bovino afetadas pela mastite em comparação com amostras de animais saudáveis (Sbodio et al. e Munro et al. El Zubeir et al., 2005). Essa diminuição pode estar relacionada aos danos causados à glândula mamária pelos patógenos, muitas vezes comprometendo o epitélio secretor, que é fundamentalmente impermeável ao transporte de cálcio do leite para o sangue (Aslam, 1998).

Em nossa pesquisa, notamos uma redução significativa nos níveis de cálcio no lado do úbere infectado a partir do segundo dia, alcançando valores ainda mais baixos no terceiro dia de infecção, quando comparados ao úbere não infectado (Fig. 7). Esses dias coincidem com os momentos em que a CCS e CBT atingem seus valores mais elevados (tabela 1 e 2), o que reforça a argumentação dos autores mencionados, acontecendo também em amostras caprina.

Reduções nos níveis séricos de zinco e ferro são mecanismos inespecíficos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas. Um estudo realizado por Lohuis e colaboradores (1990) na mastite bovina evidenciou uma correlação negativa entre a concentração de *Escherichia coli* eliminada dos quartos mamários inoculados e as concentrações plasmáticas de zinco e ferro.

Em nossa pesquisa, observamos flutuações nos níveis de ferro ao longo da infecção, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas no quinto dia, quando o úbere infectado apresentou menor teor de ferro em comparação com o úbere não infectado (Figura 8). Quando observamos todas as amostras de leite e suas correlações (figura 10), *E. coli* apresenta correlação negativa com níveis de ferro e nitrogênio.

A retenção de ferro durante infecções microbianas é um mecanismo de proteção do hospedeiro, mediado por diversos processos, incluindo a redução da absorção intestinal de ferro, a diminuição da liberação de ferro pelos macrófagos, o aumento do armazenamento de ferro por meio da síntese de

ferritina, a liberação de lactoferrina por neutrófilos e células epiteliais, e, em algumas espécies, o aumento da excreção urinária de ferro (Weinberg, 1984).

Middleton et al. (2004) estudando sobre alterações nas concentrações séricas de microminerais em bovinos com mastite induzida experimentalmente por *S. aureus*, observaram flutuações nas concentrações séricas de cobre, zinco e ferro. Os autores sugeriram que a resposta inflamatória após infecção intramamária por *S. aureus* é predominantemente local, com impacto limitado no sistema geral e, portanto, pouca influência nas concentrações séricas de oligoelementos minerais. Além disso, eles destacaram que o Cu e o Fe séricos são indicadores menos sensíveis de inflamação em comparação com o Zn sérico, sugerindo que as alterações inflamatórias mais sutis nas mastites subclínicas por *S. aureus* afetam principalmente os níveis de Zn sérico.

Observamos uma associação negativa entre *S. aureus* e os níveis de cloro e sódio, conforme ilustrado na Figura 10. As amostras provenientes do lado infectado exibiram uma correlação entre *Staphylococcus* spp. e os elementos magnésio e molibdênio, enquanto *S. aureus* mostrou associação com cloro e ferro. Por outro lado, as amostras do lado não infectado desses mesmos animais revelaram correlações entre *Staphylococcus* spp. e sódio, bem como oxigênio, conforme representado na Figura 11. Contudo, é importante destacar que essas últimas correlações não se apresentaram claramente definidas.

A concentração de Zn no leite é reconhecidamente influenciada pela saúde do úbere, e a administração de proteínatos de Zn tem sido associada à promoção da saúde mamária, reduzindo infecções intramamárias. Esse efeito benéfico pode ser atribuído à melhoria da síntese de queratina no canal do teto, conforme demonstrado por Spain et al. (2005). Além disso, o Zn exibe propriedades antioxidantes e contribui para a estabilização das membranas, sugerindo seu papel na prevenção de lesões induzidas por radicais livres durante processos inflamatórios (Prasad, 2013).

Em linha com essas constatações, a pesquisa conduzida por Sramek et al. (2019) evidenciou que caprinos com elevada CCS apresentaram valores substancialmente reduzidos de zinco. Adicionalmente, em situações de mastite induzida por *E. coli*, observou-se uma diminuição na concentração sanguínea de Zn, indicando um potencial mecanismo antibacteriano pelo qual o Zn se torna menos disponível para o crescimento bacteriano, conforme sugerido por Erskine

e Bartlett (1993). Em nossa pesquisa a presença de *Enterococcus* spp apresentou correlação positiva com níveis de cobre e zinco nas amostras do controle negativo em ambos os lados do úbere, além de também demonstrar uma associação positiva com o zinco nas amostras do úbere dos animais infectados (figura 11). Observamos uma interação dinâmica entre os níveis de minerais e as alterações na glândula mamária, revelando descobertas inéditas no contexto da infecção caprina por *Staphylococcus* coagulase negativo. Além disso, destacamos como a disbiose originada a partir de um ponto de infecção pode influenciar a composição química do leite.

O leite, composto por aproximadamente 7% de gás dissolvido, apresenta uma distribuição de 60-70% de dióxido de carbono, 25-30% de nitrogênio e 5-10% de oxigênio dissolvido (Olkonen, 2001). Coincidentemente, estudos evidenciaram que a presença de infecções bacterianas no úbere está associada a uma diminuição do oxigênio dissolvido nos tecidos mamários (Mayer et al., 1988). Durante a mastite subclínica, a concentração de oxigênio dissolvido (DOC) no leite reduz-se devido à formação de radicais livres e ao consumo de oxigênio pelos neutrófilos (Mayer et al., 1988), indicando que o DOC do leite pode potencialmente servir como um indicador da presença dessa condição.

O metabolismo microbiano é impulsionado por diferentes sistemas de oxidação-redução (Hewitt, 1950; Bolduc et al., 2006), onde o potencial de oxido-redução (ORP) do leite influencia a multiplicação bacteriana. Valores positivos de ORP favorecem a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto os anaeróbios prosperam em valores negativos de ORP em relação ao eletrodo de hidrogênio padrão (Brown et al., 1980; Bolduc et al., 2006). Em consonância, nosso estudo revelou correlações entre diversos patógenos e elementos químicos. *Corynebacterium bovis*, por exemplo, correlacionou-se com nitrogênio em todas as amostras (Figura 9), enquanto *Klebsiella* spp. demonstrou correlações com carbono, nitrogênio e oxigênio no animal controle. A presença de *E. coli* correlacionou-se com nitrogênio em todas as amostras e no lado direito dos animais infectados (Figura 9 e 10), e *Serratia marcescens* apresentou correlações com carbono e oxigênio nas amostras totais (Figura 9) e no lado direito dos animais infectados, sugerindo uma possível utilização oxidação-redução em seu metabolismo mesmo que não estejam afetando diretamente a saúde do úbere.

Por fim, salientamos que foram estabelecidas várias correlações entre diferentes micro-organismos e elementos químicos presentes no leite, evidenciando alterações perceptíveis após a inoculação experimental do patógeno desafio, *S. warneri*. Essas descobertas abrem uma perspectiva pouco explorada na literatura sobre a mastite caprina, proporcionando uma compreensão mais aprofundada das correlações dinâmicas que emergem no úbere durante eventos de infecção mamária e consequente disbiose.

2.5. CONCLUSÃO

A infecção experimental por *S. warneri* teve um impacto significativo nos elementos químicos do leite, com aumento de cloro, cálcio e cobre, diminuição de ferro, com todos possuindo flutuações ao longo do tempo de infecção. Além disso, observamos a indução de disbiose causada pela infecção, o que levou a um aumento da variedade de micro-organismos encontrados ao longo da investigação. Correlações entre diversos patógenos e os elementos químicos do leite foram traçados demonstrando uma dinâmica complexa de eventos durante o curso de uma infecção mamária caprina.

2.6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, (<https://nmm.ufv.br/>) pela disponibilização dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil) e da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira possui bolsa de produtividade do CNPq.

2.7. REFERÊNCIAS

Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, 12(8), 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>

Buriana L. M., Mahfouz M. B., Gheorghiu, A. (1981). The variation of α -lactalbumin and some other components in the whey of cows with clinical mastitis. *Egyptian Journal of Dairy Science* 9(1): 59–64

Castro, I., Alba, C., Aparicio, M., Arroyo, R., Jiménez, L., Fernández, L., Arias, R., & Rodríguez, J. M. (2019). Metataxonomic and immunological analysis of milk from ewes with or without a history of mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 9298–9311. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16403>

Chaiyabutr, N., Loypetjra, P., Burankarl, C., Angkanaporn, K., Kukiattinut, U., Chong-somnuek, J. (1988). Changes in milk composition with varying SCCs contents from crossbreed dairy cattle. *Thailand Journal of Veterinary Medicine* 18(2): 107–120

Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., & Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.011>

Contreras, G. A., & Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339–356. <https://doi.org/10.1007/S10911-011-9234-0/FIGURES/3>

Danków, R., & Pikul, J. (2011). Technological suitability of goat milk for processing. *Nauka Przyr. Technol*, 5(2), 1–15.

de Moraes Peixoto, R., de Moraes Peixoto Araújo, R., e Silva Peixoto, L. J., Gonçalves Bomfim, S. A., Guedes da Silva, T. M., Sarmiento Silva, T. M., Guedes

da Silva Almeida, J. R., Mota, R. A., & da Costa, M. M. (2015). Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. *Small Ruminant Research*, 130, 229–235. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2015.07.009>

Deinhofer, M., & Pernthaner, A. (1995). *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Veterinary Microbiology*, 43(2–3), 161–166. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)92532-G](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)92532-G)

El-Zubeir, I., ElOwani, O. A. O., & El Zubeir, I. (2005). Effect of mastitis on macro-minerals of bovine milk and blood serum in Sudan. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76, 22–25. <https://doi.org/10.4102/jsava.v76i1.389>

Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., & Stradiotto, K. (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the bergamo region of italy during a lactation year. *The Journal of Dairy Research*, 69(2), 213–225. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005459>

França, C. A. (2021). Tolerância e persistência à enrofloxacin em *Staphylococcus* spp. de mastite caprina: caracterização, determinação de fatores de virulência e genômica comparativa. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife.

Gocmen, H., Darbaz, I., Ergene, O., Esendal, O. M., & Aslan, S. (2019). The relationships between somatic cell count, total bacterial count and intramammary infection in milk samples of Damascus goats during postpartum days. *Small Ruminant Research*, 180, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.09.018>

Hewitt, L. F. *Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry*. (1950). 6th ed.; E&S Livingstone Ed.: Edinburgh

Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schütte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L. K., Williams, J. E., McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS ONE*, 6(6), e21313. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021313>

Ilectra A. Fragkou, Vasia S. Mavrogianni, Peter J. Cripps, Dimitris A. Gougoulis, & George C. Fthenakis. (2007). The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis. *Vet. Res.*, 38(4), 525–545. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007014>

Li, Z., Wright, A. D. G., Yang, Y., Si, H., & Li, G. (2017). Unique Bacteria Community Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/SREP40950>

Libera, K., Konieczny, K., Witkowska, K., Żurek, K., Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., & Smulski, S. (2021). The Association between Selected Dietary Minerals and Mastitis in Dairy Cows—A Review. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/ANI11082330>

McInnis, E. A., Kalanetra, K. M., Mills, D. A., & Maga, E. A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46, 121–131. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.07.021>

Munro, G. L., Grieve, P. A., Kitchen, B. J. (1984). Effect of mastitis on milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Australian J. Dairy Technology* 39(1): 7–16

Novac, C. S., & Andrei, S. (2020). The impact of mastitis on the biochemical parameters, oxidative and nitrosative stress markers in goat's milk: A review. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110882>

Oikonomou, G., Bicalho, M. L., Meira, E., Rossi, R. E., Foditsch, C., Machado, V. S., Teixeira, A. G. V., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2014). Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. *PLOS ONE*, 9(1), e85904. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0085904>

Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2012). Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. *PLOS ONE*, 7(10), e47671. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047671>

Peixoto, R. de M., Mota, R. A., & da Costa, M. M. (2010). Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(9), 754–762. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900008>

Pisano, M. B., Deplano, M., Fadda, M. E., & Cosentino, S. (2019). Microbiota of Sardinian Goat's Milk and Preliminary Characterization of Prevalent LAB Species for Starter or Adjunct Cultures Development. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6131404>

Polveiro, R. C., Vidigal, P. M. P., Mendes, T. A. de O., Yamatogi, R. S., Lima, M. C., & Moreira, M. A. S. (2020). Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61407-2>

Prasad, A. S. (2013). Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. *Advances in Nutrition*, 4(2), 176. <https://doi.org/10.3945/AN.112.003210>

Rolinec, M., Bíro, D., Šimko, M., Juráček, M., Gálik, B., Ondrejáková, K., & Hanušovský, O. (2018). The effect of feeding change on nutrients and minerals composition of goat's milk. *Journal of Central European Agriculture*, 19(4), 877–882. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/19.4.2363>

Sbodio, O. A., Garcia De Moagnon, S., Terenzani, S., Freyre, M. R., Romano, L., Sabbag, N. G. (1982). Contents of Ca, Mg, Na, K. and P in normal and pathological milk. *Dairy Science Abstracts* 44(8): 5683

Spain, J. N., Jones, C. A., Rapp, C. (2005). In: *Mastitis in dairy production: Current knowledge and future solutions*. Hogeveen H. The effect of complexed zinc on keratin synthesis on the teat canal and the establishment and severity of experimentally induced *E. coli* mastitis in dairy cows; p. 948.

Smith, A., Wilke, P. A., Botha, C. A. (1990). Influence of mastitis on milk production, somatic cell counts and concentrations of sodium, potassium and lactose in bovine milk. *Journal of Animal Science* 20(1): 27–30

Smith, M. C., Roguinsky, M. Mastitis and other diseases of the goat's udder (1977). *J Am Vet Med Assoc*. Dec 15;171(12):1241-8. PMID: 342465.

Sramek, Á., Bodnár, Á., Póti, P., & Pajor, F. (2018). The effect of udder health on mineral concentrations and fatty acid composition of alpine goat milk. *Animal Science Papers and Reports*, 36, 383–392.

Tormo, H., Delacroix-Buchet, A., Lopez, C., Lekhal, D. A. H., & Roques, C. (2011). Farm management practices and diversity of the dominant bacterial species in raw goat's milk. *International Journal of Dairy Science*, 6(1), 29–43. <https://doi.org/10.3923/IJDS.2011.29.43>

Wegner, T. N., & Stull, J. W. (1978). Relation between mastitis test score, mineral composition of milk, and blood electrolyte profiles in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 61(12), 1755–1759. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(78\)83798-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(78)83798-9)

2.8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar S1. Resumo dos testes t realizados para avaliar os contrastes entre as médias estimadas dos diversos conteúdos elementares do leite coletado dos úberes direito e esquerdo de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri*, considerando cada intervalo de tempo.

Variable	Time	Estimate	SE	Degree of freedom	t.ratio	p.value	Significance
C	0	-2.1351	1.3102	5	-1.6295	0.1641	ns
	1	-1.5841	1.2683	5	-1.2490	0.2669	ns
	2	0.1693	1.2319	5	0.1375	0.8960	ns
	3	1.4429	1.2015	5	1.2009	0.2836	ns
	4	0.0108	1.1775	5	0.0092	0.9931	ns
	5	0.4844	1.1605	5	0.4174	0.6937	ns
	6	-0.4581	1.1507	5	-0.3981	0.7070	ns
	7	-2.7306	1.1482	5	-2.3782	0.0633	ns
N	0	0.0000	0.1639	5	0.0000	1.0000	ns
	1	0.0852	0.1646	5	0.5178	0.6267	ns
	2	0.0000	0.1666	5	0.0000	1.0000	ns
	3	-0.2089	0.1700	5	-1.2288	0.2738	ns
	4	0.0067	0.1746	5	0.0385	0.9708	ns
	5	0.1926	0.1804	5	1.0680	0.3344	ns
	6	0.0368	0.1871	5	0.1965	0.8519	ns
	7	-0.0200	0.1949	5	-0.1026	0.9222	ns
O	0	2.1651	1.0415	5	2.0788	0.0922	ns
	1	2.1734	1.0415	5	2.0868	0.0913	ns
	2	-1.8029	1.0415	5	-1.7311	0.1440	ns
	3	-1.1027	1.0415	5	-1.0587	0.3382	ns
	4	-0.0416	1.0415	5	-0.0399	0.9697	ns
	5	-0.4391	1.0415	5	-0.4216	0.6908	ns
	6	0.1367	1.0415	5	0.1313	0.9007	ns
	7	1.6779	1.0415	5	1.6110	0.1681	ns
Na	0	-0.3859	0.2956	5	-1.3058	0.2485	ns
	1	-0.4784	0.2765	5	-1.7301	0.1442	ns
	2	0.5031	0.2587	5	1.9447	0.1094	ns
	3	0.2032	0.2423	5	0.8386	0.4399	ns
	4	-0.0321	0.2278	5	-0.1410	0.8934	ns
	5	0.1346	0.2154	5	0.6251	0.5593	ns
	6	0.0851	0.2056	5	0.4138	0.6962	ns
	7	0.0716	0.1987	5	0.3602	0.7334	ns
Mg	0	0.0029	0.0322	5	0.0896	0.9321	ns
	1	-0.0218	0.0322	5	-0.6755	0.5293	ns
	2	0.0134	0.0322	5	0.4153	0.6952	ns
	3	-0.0084	0.0322	5	-0.2602	0.8051	ns
	4	0.0114	0.0322	5	0.3550	0.7371	ns
	5	-0.0133	0.0322	5	-0.4110	0.6981	ns
	6	0.0000	0.0322	5	0.0000	1.0000	ns
	7	-0.0299	0.0322	5	-0.9271	0.3964	ns
P	0	0.0086	0.0927	5	0.0931	0.9294	ns
	1	0.0167	0.0843	5	0.1983	0.8506	ns
	2	0.0974	0.0842	5	1.1560	0.2999	ns
	3	-0.0260	0.0778	5	-0.3336	0.7522	ns
	4	-0.0642	0.0752	5	-0.8538	0.4322	ns
	5	0.0019	0.0710	5	0.0273	0.9793	ns
	6	-0.0843	0.0698	5	-1.2071	0.2814	ns
	7	0.0711	0.0671	5	1.0606	0.3374	ns

Cl	0	-0.2480	0.2717	5	-0.9127	0.4033	ns
	1	-0.5834	0.2717	5	-2.1470	0.0846	ns
	2	0.7280	0.2717	5	2.6792	0.0439	*
	3	0.1828	0.2717	5	0.6727	0.5310	ns
	4	0.0587	0.2717	5	0.2161	0.8374	ns
	5	-0.1094	0.2717	5	-0.4026	0.7039	ns
	6	0.0801	0.2717	5	0.2946	0.7801	ns
	7	0.2638	0.2717	5	0.9708	0.3762	ns
K	0	0.1900	0.2485	5	0.7646	0.4790	ns
	1	-0.1509	0.2523	5	-0.5979	0.5760	ns
	2	0.1125	0.2358	5	0.4771	0.6534	ns
	3	0.0854	0.2410	5	0.3542	0.7376	ns
	4	0.0901	0.2333	5	0.3864	0.7151	ns
	5	-0.0617	0.2313	5	-0.2667	0.8004	ns
	6	-0.1476	0.2221	5	-0.6647	0.5357	ns
	7	0.3100	0.2195	5	1.4122	0.2170	ns
Ca	0	0.1574	0.1525	5	1.0323	0.3493	ns
	1	0.5533	0.1375	5	4.0232	0.0101	*
	2	0.0493	0.1264	5	0.3903	0.7124	ns
	3	-0.3972	0.1138	5	-3.4894	0.0175	*
	4	0.0839	0.1047	5	0.8006	0.4597	ns
	5	0.0250	0.0967	5	0.2580	0.8067	ns
	6	-0.0215	0.0930	5	-0.2314	0.8262	ns
	7	0.1127	0.0905	5	1.2445	0.2685	ns
Fe	0	-0.0108	0.0092	75	-1.1747	0.2438	ns
	1	-0.0022	0.0092	75	-0.2422	0.8093	ns
	2	0.0096	0.0092	75	1.0415	0.3010	ns
	3	-0.0182	0.0092	75	-1.9801	0.0514	ns
	4	0.0088	0.0092	75	0.9628	0.3388	ns
	5	-0.0263	0.0092	75	-2.8702	0.0053	**
	6	0.0037	0.0092	75	0.4057	0.6861	ns
	7	0.0102	0.0092	75	1.1142	0.2688	ns
Cu	0	0.0073	0.0992	75	0.0734	0.9417	ns
	1	0.0037	0.0992	75	0.0370	0.9706	ns
	2	0.0327	0.0992	75	0.3294	0.7428	ns
	3	-0.0349	0.0992	75	-0.3518	0.7260	ns
	4	-0.0667	0.0992	75	-0.6728	0.5031	ns
	5	-0.0106	0.0992	75	-0.1070	0.9151	ns
	6	0.0213	0.0992	75	0.2146	0.8307	ns
	7	0.3055	0.0992	75	3.0808	0.0029	**
Zn	0	0.0018	0.0814	75	0.0219	0.9826	ns
	1	0.0082	0.0814	75	0.1004	0.9203	ns
	2	0.0074	0.0814	75	0.0908	0.9279	ns
	3	-0.0207	0.0814	75	-0.2540	0.8002	ns
	4	-0.0486	0.0814	75	-0.5968	0.5524	ns
	5	-0.0186	0.0814	75	-0.2284	0.8199	ns
	6	0.0279	0.0814	75	0.3435	0.7322	ns
	7	0.1414	0.0814	75	1.7379	0.0863	ns
Mo	0	-0.0487	0.0821	5	-0.5934	0.5787	ns
	1	-0.0144	0.0796	5	-0.1809	0.8636	ns
	2	0.1471	0.0773	5	1.9036	0.1153	ns
	3	0.0448	0.0753	5	0.5954	0.5775	ns
	4	-0.0577	0.0736	5	-0.7832	0.4690	ns
	5	-0.0208	0.0723	5	-0.2873	0.7854	ns
	6	-0.0030	0.0713	5	-0.0423	0.9679	ns
	7	0.0249	0.0707	5	0.3526	0.7388	ns

ns: represents non-significant contrasts; * and ** represents significant contrasts at 5 and 1% significance, respectively.

Tabela Suplementar S2. Resumo dos testes t realizados para avaliar os contrastes entre as médias estimadas dos diversos conteúdos elementares do leite coletado dos úberes direito e esquerdo de cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri*, considerando cada intervalo de tempo.

Variable	Time	Udder	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
C	0	Left udder	51.8598	1.1102	5	49.0060	54.7136	a
		Right udder	49.7248	1.1102	5	46.8710	52.5786	a
	1	Left udder	48.6863	1.0648	5	45.9492	51.4235	a
		Right udder	47.1022	1.0648	5	44.3651	49.8394	a
	2	Right udder	51.4039	1.0268	5	48.7644	54.0435	a
		Left udder	51.2346	1.0268	5	48.5951	53.8742	a
	3	Right udder	48.0203	0.9971	5	45.4570	50.5835	a
		Left udder	46.5774	0.9971	5	44.0142	49.1406	a
	4	Right udder	48.0472	0.9765	5	45.5371	50.5573	a
		Left udder	48.0364	0.9765	5	45.5264	50.5465	a
	5	Right udder	44.8048	0.9654	5	42.3231	47.2864	a
		Left udder	44.3203	0.9654	5	41.8387	46.8020	a
	6	Left udder	49.0023	0.9643	5	46.5236	51.4810	a
		Right udder	48.5442	0.9643	5	46.0655	51.0229	a
7	Left udder	49.5477	0.9731	5	47.0463	52.0491	a	
	Right udder	46.8171	0.9731	5	44.3157	49.3185	a	
N	0	Left udder	0.0000	0.1159	5	-0.2979	0.2979	a
		Right udder	0.0000	0.1159	5	-0.2979	0.2979	a
	1	Right udder	0.0852	0.1164	5	-0.2139	0.3844	a
		Left udder	0.0000	0.1164	5	-0.2991	0.2991	a
	2	Right udder	0.0000	0.1178	5	-0.3029	0.3029	a
		Left udder	0.0000	0.1178	5	-0.3029	0.3029	a
	3	Left udder	0.2089	0.1202	5	-0.1001	0.5179	a
		Right udder	0.0000	0.1202	5	-0.3090	0.3090	a
	4	Right udder	0.2742	0.1235	5	-0.0432	0.5916	a
		Left udder	0.2675	0.1235	5	-0.0499	0.5849	a
	5	Right udder	0.9444	0.1275	5	0.6166	1.2723	a
		Left udder	0.7518	0.1275	5	0.4240	1.0797	a
	6	Right udder	0.0532	0.1323	5	-0.2870	0.3933	a
		Left udder	0.0164	0.1323	5	-0.3238	0.3566	a
7	Left udder	0.0200	0.1378	5	-0.3342	0.3742	a	
	Right udder	0.0000	0.1378	5	-0.3542	0.3542	a	
O	0	Right udder	40.6499	1.0883	5	37.8524	43.4475	a
		Left udder	38.4849	1.0883	5	35.6873	41.2825	a
	1	Right udder	41.1712	1.0425	5	38.4913	43.8511	a
		Left udder	38.9977	1.0425	5	36.3178	41.6776	a
	2	Left udder	39.2703	1.0010	5	36.6972	41.8434	a
		Right udder	37.4673	1.0010	5	34.8942	40.0404	a
	3	Left udder	41.4760	0.9642	5	38.9975	43.9545	a
		Right udder	40.3733	0.9642	5	37.8948	42.8518	a

4	Left udder	40.7684	0.9327	5	38.3708	43.1660	a		
	Right udder	40.7268	0.9327	5	38.3292	43.1245	a		
5	Left udder	43.1368	0.9071	5	40.8050	45.4687	a		
	Right udder	42.6978	0.9071	5	40.3659	45.0296	a		
6	Right udder	40.4624	0.8879	5	38.1800	42.7449	a		
	Left udder	40.3257	0.8879	5	38.0432	42.6082	a		
7	Right udder	41.1722	0.8755	5	38.9216	43.4229	a		
	Left udder	39.4943	0.8755	5	37.2437	41.7450	a		
Na	0	Left udder	1.2795	0.2357	5	0.6736	1.8854	a	
		Right udder	0.8936	0.2357	5	0.2877	1.4994	a	
	1	Left udder	1.4963	0.2238	5	0.9209	2.0717	a	
		Right udder	1.0179	0.2238	5	0.4425	1.5933	a	
	2	Right udder	1.6171	0.2129	5	1.0698	2.1644	a	
		Left udder	1.1140	0.2129	5	0.5667	1.6613	a	
	3	Right udder	1.3783	0.2031	5	0.8563	1.9003	a	
		Left udder	1.1751	0.2031	5	0.6531	1.6970	a	
	4	Left udder	1.0909	0.1945	5	0.5911	1.5908	a	
		Right udder	1.0588	0.1945	5	0.5590	1.5587	a	
	5	Right udder	1.1990	0.1873	5	0.7176	1.6803	a	
		Left udder	1.0643	0.1873	5	0.5830	1.5457	a	
	6	Right udder	1.1184	0.1817	5	0.6514	1.5853	a	
		Left udder	1.0333	0.1817	5	0.5664	1.5003	a	
	7	Right udder	1.0730	0.1778	5	0.6160	1.5300	a	
		Left udder	1.0014	0.1778	5	0.5445	1.4584	a	
	Mg	0	Right udder	0.4253	0.0228	5	0.3667	0.4839	a
			Left udder	0.4224	0.0228	5	0.3638	0.4810	a
		1	Left udder	0.4606	0.0228	5	0.4020	0.5192	a
			Right udder	0.4388	0.0228	5	0.3802	0.4974	a
2		Right udder	0.4244	0.0228	5	0.3658	0.4830	a	
		Left udder	0.4111	0.0228	5	0.3525	0.4697	a	
3		Left udder	0.4733	0.0228	5	0.4147	0.5319	a	
		Right udder	0.4649	0.0228	5	0.4063	0.5235	a	
4		Right udder	0.4511	0.0228	5	0.3925	0.5097	a	
		Left udder	0.4397	0.0228	5	0.3811	0.4983	a	
5		Left udder	0.4830	0.0228	5	0.4244	0.5416	a	
		Right udder	0.4698	0.0228	5	0.4111	0.5284	a	
6		Left udder	0.4468	0.0228	5	0.3882	0.5054	a	
		Right udder	0.4468	0.0228	5	0.3882	0.5054	a	
7	Left udder	0.4826	0.0228	5	0.4240	0.5412	a		
	Right udder	0.4527	0.0228	5	0.3941	0.5113	a		
P	0	Right udder	1.1507	0.0692	5	0.9727	1.3287	a	
		Left udder	1.1421	0.0691	5	0.9645	1.3197	a	
	1	Right udder	1.4836	0.0658	5	1.3145	1.6526	a	
		Left udder	1.4668	0.0657	5	1.2978	1.6359	a	
	2	Right udder	1.2705	0.0681	5	1.0955	1.4455	a	
		Left udder	1.1731	0.0689	5	0.9961	1.3502	a	

3	Left udder	1.4331	0.0679	5	1.2586	1.6076	a	
	Right udder	1.4071	0.0682	5	1.2317	1.5825	a	
4	Left udder	1.4132	0.0702	5	1.2326	1.5937	a	
	Right udder	1.3490	0.0709	5	1.1667	1.5312	a	
5	Right udder	1.4714	0.0729	5	1.2840	1.6587	a	
	Left udder	1.4694	0.0728	5	1.2823	1.6566	a	
6	Left udder	1.4198	0.0768	5	1.2224	1.6171	a	
	Right udder	1.3355	0.0775	5	1.1363	1.5347	a	
7	Right udder	1.4453	0.0809	5	1.2375	1.6531	a	
	Left udder	1.3742	0.0813	5	1.1653	1.5831	a	
CI	0	Left udder	2.3123	0.2203	5	1.7460	2.8786	a
		Right udder	2.0643	0.2203	5	1.4980	2.6306	a
	1	Left udder	3.0464	0.2203	5	2.4802	3.6127	a
		Right udder	2.4631	0.2203	5	1.8968	3.0293	a
	2	Right udder	2.9177	0.2203	5	2.3514	3.4840	a
		Left udder	2.1897	0.2203	5	1.6234	2.7560	b
	3	Right udder	2.9039	0.2203	5	2.3377	3.4702	a
		Left udder	2.7212	0.2203	5	2.1549	3.2874	a
	4	Right udder	2.4376	0.2203	5	1.8713	3.0039	a
		Left udder	2.3789	0.2203	5	1.8126	2.9452	a
	5	Left udder	2.7354	0.2203	5	2.1692	3.3017	a
		Right udder	2.6261	0.2203	5	2.0598	3.1923	a
	6	Right udder	2.4054	0.2203	5	1.8392	2.9717	a
		Left udder	2.3254	0.2203	5	1.7591	2.8917	a
7	Right udder	2.6311	0.2203	5	2.0648	3.1973	a	
	Left udder	2.3673	0.2203	5	1.8010	2.9336	a	
K	0	Right udder	2.1254	0.2377	5	1.5142	2.7365	a
		Left udder	1.9354	0.2393	5	1.3201	2.5506	a
	1	Left udder	2.7605	0.2364	5	2.1527	3.3683	a
		Right udder	2.6096	0.2315	5	2.0144	3.2048	a
	2	Right udder	1.9892	0.2197	5	1.4243	2.5541	a
		Left udder	1.8767	0.2229	5	1.3038	2.4496	a
	3	Right udder	2.6855	0.2214	5	2.1165	3.2546	a
		Left udder	2.6001	0.2247	5	2.0224	3.1779	a
	4	Right udder	2.5211	0.2192	5	1.9575	3.0847	a
		Left udder	2.4309	0.2225	5	1.8590	3.0029	a
	5	Left udder	2.7305	0.2269	5	2.1472	3.3138	a
		Right udder	2.6688	0.2226	5	2.0966	3.2410	a
	6	Left udder	2.5317	0.2303	5	1.9396	3.1238	a
		Right udder	2.3841	0.2257	5	1.8038	2.9644	a
7	Right udder	2.7801	0.2369	5	2.1712	3.3890	a	
	Left udder	2.4701	0.2377	5	1.8592	3.0811	a	
Ca	0	Right udder	1.6381	0.1147	5	1.3434	1.9329	a
		Left udder	1.4807	0.1151	5	1.1849	1.7765	a
	1	Right udder	2.2688	0.1049	5	1.9991	2.5384	a
		Left udder	1.7155	0.1059	5	1.4432	1.9878	b

	2	Right udder	1.5476	0.0998	5	1.2911	1.8042	a
		Left udder	1.4983	0.1000	5	1.2414	1.7553	a
	3	Left udder	2.0379	0.0948	5	1.7943	2.2816	a
		Right udder	1.6408	0.0957	5	1.3949	1.8867	b
	4	Right udder	1.7367	0.0943	5	1.4942	1.9792	a
		Left udder	1.6529	0.0946	5	1.4098	1.8960	a
	5	Right udder	1.8450	0.0960	5	1.5983	2.0917	a
		Left udder	1.8201	0.0960	5	1.5732	2.0670	a
	6	Left udder	1.6674	0.1011	5	1.4076	1.9273	a
		Right udder	1.6459	0.1011	5	1.3860	1.9058	a
	7	Right udder	1.9280	0.1076	5	1.6515	2.2045	a
		Left udder	1.8153	0.1078	5	1.5382	2.0925	a
Fe	0	Left udder	0.0746	0.0075	5	0.0554	0.0938	a
		Right udder	0.0638	0.0075	5	0.0447	0.0830	a
	1	Left udder	0.0694	0.0073	5	0.0507	0.0882	a
		Right udder	0.0672	0.0073	5	0.0485	0.0860	a
	2	Right udder	0.0732	0.0072	5	0.0548	0.0916	a
		Left udder	0.0637	0.0072	5	0.0453	0.0821	a
	3	Left udder	0.0810	0.0071	5	0.0629	0.0991	a
		Right udder	0.0628	0.0071	5	0.0447	0.0810	a
	4	Right udder	0.0797	0.0070	5	0.0618	0.0976	a
		Left udder	0.0708	0.0070	5	0.0529	0.0887	a
	5	Left udder	0.0856	0.0069	5	0.0678	0.1033	a
		Right udder	0.0592	0.0069	5	0.0414	0.0770	b
	6	Right udder	0.0591	0.0069	5	0.0414	0.0768	a
		Left udder	0.0554	0.0069	5	0.0377	0.0731	a
7	Right udder	0.0764	0.0069	5	0.0587	0.0942	a	
	Left udder	0.0662	0.0069	5	0.0485	0.0840	a	
Cu	0	Right udder	0.0837	0.0716	5	-0.1003	0.2677	a
		Left udder	0.0764	0.0716	5	-0.1076	0.2604	a
	1	Right udder	0.1247	0.0716	5	-0.0593	0.3087	a
		Left udder	0.1211	0.0716	5	-0.0630	0.3051	a
	2	Right udder	0.1496	0.0716	5	-0.0345	0.3336	a
		Left udder	0.1169	0.0716	5	-0.0671	0.3009	a
	3	Left udder	0.1617	0.0716	5	-0.0223	0.3457	a
		Right udder	0.1268	0.0716	5	-0.0572	0.3108	a
	4	Left udder	0.2946	0.0716	5	0.1106	0.4786	a
		Right udder	0.2279	0.0716	5	0.0439	0.4119	a
	5	Left udder	0.1639	0.0716	5	-0.0201	0.3480	a
		Right udder	0.1533	0.0716	5	-0.0307	0.3373	a
	6	Right udder	0.1343	0.0716	5	-0.0497	0.3183	a
		Left udder	0.1130	0.0716	5	-0.0710	0.2970	a
7	Right udder	0.4088	0.0716	5	0.2248	0.5928	a	
	Left udder	0.1033	0.0716	5	-0.0807	0.2873	b	
Zn	0	Right udder	0.1304	0.0606	5	-0.0254	0.2861	a
		Left udder	0.1286	0.0606	5	-0.0271	0.2844	a

Mo	1	Right udder	0.0963	0.0606	5	-0.0594	0.2521	a
		Left udder	0.0882	0.0606	5	-0.0676	0.2439	a
	2	Right udder	0.0959	0.0606	5	-0.0598	0.2517	a
		Left udder	0.0886	0.0606	5	-0.0672	0.2443	a
	3	Left udder	0.1189	0.0606	5	-0.0368	0.2747	a
		Right udder	0.0983	0.0606	5	-0.0575	0.2540	a
	4	Left udder	0.3579	0.0606	5	0.2022	0.5137	a
		Right udder	0.3094	0.0606	5	0.1536	0.4651	a
	5	Left udder	0.1141	0.0606	5	-0.0416	0.2699	a
		Right udder	0.0955	0.0606	5	-0.0602	0.2513	a
	6	Right udder	0.1034	0.0606	5	-0.0524	0.2591	a
		Left udder	0.0754	0.0606	5	-0.0803	0.2312	a
	7	Right udder	0.2571	0.0606	5	0.1014	0.4129	a
		Left udder	0.1157	0.0606	5	-0.0400	0.2715	a
	0	Left udder	0.8794	0.0683	5	0.7039	1.0549	a
		Right udder	0.8307	0.0683	5	0.6552	1.0062	a
	1	Left udder	1.0457	0.0627	5	0.8847	1.2068	a
		Right udder	1.0313	0.0627	5	0.8703	1.1924	a
	2	Right udder	1.0526	0.0584	5	0.9025	1.2027	a
		Left udder	0.9055	0.0584	5	0.7554	1.0556	a
	3	Right udder	0.9627	0.0558	5	0.8192	1.1061	a
		Left udder	0.9178	0.0558	5	0.7744	1.0613	a
	4	Left udder	1.0684	0.0551	5	0.9268	1.2101	a
		Right udder	1.0108	0.0551	5	0.8692	1.1524	a
	5	Left udder	1.0700	0.0564	5	0.9251	1.2149	a
		Right udder	1.0492	0.0564	5	0.9044	1.1941	a
	6	Left udder	0.9689	0.0595	5	0.8161	1.1218	a
		Right udder	0.9659	0.0595	5	0.8131	1.1188	a
	7	Right udder	1.0175	0.0641	5	0.8526	1.1824	a
		Left udder	0.9926	0.0641	5	0.8277	1.1574	a

3. CAPÍTULO 2:

N-acetil- β -glucosaminidase aliado no diagnóstico de mastite caprina

Jéssica Lobo Albuquerque Caldeira¹ Richard Costa Polveiro¹ Luisa Maria de Souza Menezes¹
Mariana de Barros¹ Juliana Miwa Fujikura¹ Wagner Faria Barbosa² Maria Aparecida
Scatamburlo Moreira^{1*}

¹ Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
MG, Brazil.

² Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

* Corresponding author:

Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa,
Campus Universitário, avenida PH Rolfs, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

masm@ufv.br

RESUMO

A mastite é uma condição inflamatória da glândula mamária que pode levar a diversas alterações, incluindo alterações significativas na atividade enzimática glandular, dependendo do patógeno causador. O gênero *Staphylococcus* é frequentemente associado à mastite intramamária em cabras, sendo os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) o grupo de patógenos mais prevalente responsável pela mastite subclínica em animais de produção. O diagnóstico de mastite em caprinos é frequentemente realizado por meio de testes padronizados para bovinos, principalmente a Contagem de Células Somáticas (CCS), porém, o uso dessas técnicas em caprinos ainda é limitado devido às especificidades biológicas desses animais. Este estudo teve como objetivo investigar o comportamento da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) em 112 amostras de leite de animais infectados experimentalmente por *S. warneri*. Adicionalmente, foi analisado 49 amostras de leite de animais naturalmente infectados em vários estágios de mastite. A atividade da NAGase foi realizada por método fluorométrico, e a CCS e Contagem Bacteriana Total (CBT) por citometria de fluxo, sendo estes testes utilizados como parâmetro da evolução da mastite e acompanhamento da infecção. Modelos estatísticos foram aplicados. Os resultados mostraram que a atividade da NAGase foi expressa em maiores quantidades no leite de cabras infectadas experimentalmente com *S. warneri*, com pico da enzima dois dias após a inoculação. A combinação da NAGase com o CCS proporcionou um diagnóstico mais preciso e diferencial em animais naturalmente infectados. Concluindo, este estudo demonstrou que a atividade da NAGase pode ser utilizada como indicador de mastite em caprinos, inclusive em estágios iniciais da infecção, sendo uma ferramenta útil para o diagnóstico e monitoramento da doença quando combinada com CCS.

Palavras-chave: Leite. *Staphylococcus*. Contagem de Células Somáticas. NAGase.

3.1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma condição inflamatória da glândula mamária que pode levar a várias alterações, dependendo do patógeno causador, da gravidade das lesões e dos danos ao parênquima do úbere. A mastite subclínica é mais comum em pequenos ruminantes do que a mastite clínica e pode causar alterações nos componentes do leite e uma redução na produção, resultando em perdas econômicas para os produtores. (Gosselin et al., 2018; Wang et al., 2019). O gênero *Staphylococcus* é frequentemente associado à infecção intramamária (IMI) em pequenos ruminantes, sendo o *Staphylococcus* coagulase-negativo (CNS) o grupo de patógenos mais prevalente responsável pela mastite subclínica em animais de produção. (Gocmen et al., 2019; Novac e Andrei, 2020).

Está bem estabelecido que o leite de vacas com mastite pode fornecer informações úteis sobre a infecção bacteriana, uma vez que as mudanças em seus componentes refletem os eventos no alvéolo mamário durante a infecção. Essas mudanças incluem alterações significativas na atividade enzimática da glândula mamária, onde as enzimas envolvidas na síntese do leite são reduzidas e as enzimas nativas aumentam durante os processos inflamatórios. (Fox e Kelly, 2006; Pyörälä, 2003).

Dentro das enzimas do leite, destacam-se duas categorias: enzimas não lisossomais, como a lactato desidrogenase (LDH), e lisossomais, como β -galactosidase, N-acetil- β -glucosaminidase (NAGase), α -manosidase e β -glucuronidase, cujas atividades aumentam em inflamações (Albenzio e Santillo, 2011). A LDH, NAGase e fosfatases, tem sido utilizadas como indicadores para avaliar o dano às células mamárias e a qualidade do leite em mastites, apresentando variações significativas entre animais saudáveis e aqueles com mastite subclínica e clínica, documentada principalmente em bovinos (Chagunda et al., 2006; Nagargoje et al., 2023).

O diagnóstico de mastite em caprinos frequentemente emprega métodos padronizados para bovinos, como o Califórnia Mastitis Test (CMT), cultura bacteriana e a Contagem de Células Somáticas (CCS) (Contreras et al., 2007). A IMI geralmente resulta na proliferação bacteriana no leite, elevando tanto a Contagem Total de Bactérias (CTB) quanto a CCS. Embora a CCS seja útil para

o controle da mastite, sua aplicação em caprinos requer ajustes devido às particularidades biológicas destes animais. Por exemplo, a CCS em glândulas mamárias saudáveis de caprinos é naturalmente mais elevada do que em bovinos, atribuído em parte à secreção apócrina nas glândulas mamárias caprinas (Paape et al., 2001).

Portanto, a CCS não se estabelece como um critério diagnóstico confiável para caprinos, dada a influência de diversos fatores sobre as células somáticas no leite, como estágio de lactação, estro, raça e método de ordenha (Barth et al., 2010; Koop et al., 2010; Dimitrov et al., 2018). Em contraste, a NAGase emerge como um marcador promissor para o diagnóstico de mastite em ruminantes, incluindo cabras, devido à sua elevada atividade em glândulas mamárias em processos inflamatórios. Pesquisas evidenciam níveis aumentados de NAGase em casos de mastite bovina, inclusive subclínicos causados por CNS (Maisi, 1990; Barth et al., 2010; Kumar et al., 2019).

No entanto, a falta de uma metodologia padronizada ou critérios claros para utilizar a NAGase na categorização de animais com mastite reforça a necessidade de pesquisas adicionais. Tais estudos são essenciais para fornecer diretrizes mais precisas, facilitando intervenções e tratamentos adequados para caprinos com mastite.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) no leite de animais infectados experimentalmente por *Staphylococcus warneri*, além de analisar amostras de leite de animais naturalmente infectados em vários estágios de mastite com a finalidade de demonstrar o potencial diagnóstico desta ferramenta.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental, número 62/2018, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2.1. Amostras

3.2.1.1. Infecção Experimental

Sete cabras fêmeas saudáveis da raça Parda Alpina, com proximidade genealógica, foram selecionadas da unidade de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa. Todas eram primíparas, lactantes e não haviam sido tratadas

com antibióticos ou medicamentos influentes. Após avaliação clínica quanto a sinais de mastite e anormalidades no leite, foram alojadas em baias individuais higienizadas diariamente, com medidas de biossegurança, incluindo pedilúvios com cal virgem para descontaminação e áreas separadas para higienização.

Durante as duas semanas de adaptação, foram submetidas a três lactoculturas negativas para IMI antes da inoculação.

Em seis animais, um dos lados do úbere (direito) foi inoculado com uma dose de $1,2 \times 10^8$ UFC/ml do isolado de *S. warneri*, administrado por via intramamária no volume de 2 ml, conforme descrito por Moraes Peixoto et al. (2015). O isolado foi previamente obtido a partir de um caso de mastite caprina subclínica persistente identificada anteriormente por testes microbiológicos e moleculares (França, 2021 - Dados não publicados). Uma cabra controle negativo foi inoculada com 2 ml de solução salina estéril no lado direito do úbere, submetida a mesma coleta dos outros animais e serviu como referência nas análises. Durante todo o período de infecção, amostras de leite eram submetidas a placas de ágar sangue e ágar cromogênico Accumast® para acompanhamento microbiológico.

As coletas de amostras de leite para as análises foram realizadas em duplicata em tubos de centrifugação de 50ml estéril durante a ordenha manual, realizando pré e pós-dipping além assepsia com álcool 70% nos úberes manipulados, e prontamente levadas ao laboratório para alíquotar e dar destino adequado.

Todas as 112 amostras de leite, que compreendem o dia 0 (antes da infecção) e os sete dias subsequentes, foram analisadas quanto a atividade de NAGase, Contagem de Células Somáticas, a Contagem Bacteriana Total,

3.2.1.2. Animais de campo

Para investigar a IMI em cabras naturalmente infectadas, comparando a atividade da enzima NAGase com o parâmetro da CCS, 49 amostras de leite provenientes de animais de campo com histórico de mastite clínica ou subclínica foram examinadas.

Com base nos dados, juntamente com o histórico clínico do animal, as amostras foram divididas em quatro grupos: (i) animais saudáveis sem histórico

de mastite (n = 10); (ii) animais com mastite subclínica leve + (n = 5); (iii) animais com mastite subclínica moderada ++ (n = 19) e (iv) animais com mastite clínica (n = 15).

3.2.2. Atividade de N-acetyl- β -D-glucosaminidase

Foi utilizado um ensaio fluorométrico modificado em placa para medir a atividade da NAGase nas amostras de leite (Hovinen et al., 2016). Assim, foram pipetados em duplicata dez microlitros da amostra de teste, controle positivo (animal com mastite clínica), controle negativo (animal clinicamente saudável) e amostra em branco (água destilada) em uma placa e incubados com 40 μ l do substrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-D-glucosaminídeo (2,25 mM 4-MUAG, M-2133 Sigma-Aldrich®). A reação foi interrompida pela adição de 150 μ l de tampão glicina (0,2 M, pH 11).

A fluorescência do produto 4-metilumbeliferona (4-MU) gerada pela atividade da NAGase foi medida em um fluorímetro usando um filtro de excitação de 355 nm e um filtro de emissão de 460 nm, e as médias de fluorescência das amostras duplicadas foram calculadas e subtraídas pela média de fluorescência da água destilada (amostra em branco).

A atividade da NAGase foi expressa em pmol de 4-MU/min/ μ l de leite a 20°C. Assim, a atividade da enzima foi calculada usando a equação: Atividade da NAGase da amostra = fluorescência de (amostra menos branco) \times Atividade da NAGase do controle 1 / fluorescência de (controle 1 menos branco). O Controle 1 mencionado na equação foi definido de acordo com a curva padrão, descrito abaixo.

3.2.2.1. Curva padrão

A análise da atividade da NAGase baseou-se em uma curva padrão que foi realizada medindo a fluorescência de 10 diferentes concentrações conhecidas de 4-MU (1-450 μ M de 4-MU em tampão glicina). Os valores da curva previamente estabelecidos foram usados para analisar a atividade da NAGase no leite de uma cabra com mastite clínica (controle 1), e os limites inferiores e superiores de quantificação para a análise foram determinados a partir da seção linear da curva encontrada. A fluorescência do controle 1 menos o branco (água) foi dividido pelo coeficiente angular, o que produziu a molaridade respectiva do

controle 1. Foram realizadas dez réplicas em três momentos diferentes para determinar com precisão esse valor, que serviu como parâmetro para a análise de NAGase das amostras de teste.

3.2.3. Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total

Para acompanhar a evolução da IMI e avaliar o aumento da contaminação do leite devido à infecção experimental, as amostras de leite foram examinadas quanto à CCS e CTB. As amostras foram armazenadas em frascos contendo os conservantes Bronopol® e comprimidos de Azidiol, refrigeradas entre 2°C e 6°C até as análises. CCS foi realizada pelo método de citometria de fluxo usando o equipamento eletrônico da marca ©Bentley Instruments, modelo NexGen Somacount FCM Bentley FTS. A CTB foi determinada pelo equipamento eletrônico da marca ©Bentley Instrument, modelo Bactcount IBC, ambos realizados na EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Para as amostras de leite de animais a campo, a CCS foi empregada como um indicador de mastite. Os animais foram classificados como mastíticos ou não mastíticos com base nos valores de CCS, sendo considerados mastíticos aqueles com valores iguais ou superiores a 2.000.000 de células/ml, conforme estabelecido por Souza et al. (2012), um critério mais utilizado na literatura para mastite em caprinos.

3.2.4. Análise estatística

Para analisar a atividade da NAGase, a CCS e a CTB das amostras de infecção experimental, foram utilizados modelos aditivos generalizados (GAM) com estimativa de suavização integrada. O tratamento (controle ou inoculação bacteriana) foi adicionado aos modelos como um efeito fixo, e diferentes distribuições de erros foram consideradas. Os modelos foram escolhidos por meio do teste F ($P < 0,05$), R^2 ajustado e análise visual dos gráficos de resíduos.

A CCS foi adotada como indicador de mastite para avaliar cabras em amostras de leite do campo. Os indivíduos foram classificados como mastíticos ou não mastíticos com base nos valores de CCS, estabelecendo um limiar de 2.000.000 células/ml, conforme definido por Souza et al. (2012). Parâmetros descritivos, incluindo média, desvio padrão, máximo e mínimo, foram calculados para a atividade da NAGase e CCS em cada grupo. Dada a magnitude dos

valores observados, análises logarítmicas (base 10) foram incorporadas. Adicionalmente, uma correlação de Pearson e um teste *t* de Student ($P < 0,05$) foram empregados para investigar a relação linear entre a atividade da NAGase e CCS.

Finalmente, para entender como a atividade da NAGase e a CCS podem identificar conjuntamente diferentes níveis de mastite caprina (saudável, mastite subclínica +, mastite subclínica ++ e mastite clínica), foi treinado e testado (validado) um modelo de árvore de decisão de classificação (Quinlan 1986; Shalev-Shwartz e Ben-David 2014), respectivamente, com 80% e 20% dos dados de campo, que foram previamente logaritmados (base 10).

Todas as análises foram realizadas no R (R Core Team 2022) e assistidas por alguns pacotes R. Portanto, os GAM, as análises descritivas, a correlação linear e o ajuste da árvore de decisão foram realizados usando, respectivamente, os pacotes "mgcv" (Wood, 2017), "tidyverse" (Wickham et al. 2019), "stats" (um pacote base do R) e "tree" (Ripley 2022). Além disso, o gráfico foi plotado usando o pacote "ggplot2" (Wickham 2016) e ajustado com o CorelDraw X8 (<https://www.coreldraw.com/en/>).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Infecção Experimental

Conforme ilustrado na Figura 1, observou-se um pico na atividade da NAGase dois dias após a inoculação, atingindo 35.235 pmoles de 4-MU/min/ μ l de leite, em contraste com o grupo controle que registrou 5.017 pmoles de 4-MU/min/ μ l de leite, evidenciando uma diferença significativa ($P < 0,0001$). Esta disparidade manteve-se estatisticamente relevante até o quinto dia pós-inoculação. A análise temporal da NAGase foi adequadamente modelada por um modelo aditivo generalizado, utilizando a distribuição de erros quasipoisson, (deviance explicada = 82,2%). Termos suaves significativos para a placa (tratada como efeito aleatório) ($P < 0,0001$) e para a interação tempo-tratamento ($P < 0,0001$) indicaram uma interação entre os fatores.

A Figura 2, demonstrou um pico no CCS dois dias após a inoculação, alcançando 9.746.450 células/ml, em contraste com o grupo de controle que registrou 571.624 células/ml, evidenciando uma diferença significativa ($P < 0,0001$). Esta disparidade manteve-se estatisticamente relevante até o sétimo

dia pós-inoculação ($P = 0,0465$). A modelagem da CCS ao longo do tempo foi otimizada ao utilizar uma família quase de distribuição de erros (deviance explicada = 69,6%). Embora o efeito aleatório da placa não tenha sido significativo ($P = 0,467$), o modelo foi simplificado, destacando um termo temporal por tratamento significativo ($P < 0,0001$).

Conforme evidenciado na Figura 3, a CBT atingiu seu pico dois dias após a inoculação, registrando 3.491.131 ufc/ml, em contrapartida ao controle que apresentou 21.800 ufc/ml, revelando uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$). Essa discrepância manteve-se até o quarto dia pós-inoculação, com significância estatística ($P = 0,0036$). A modelagem do CBT ao longo do tempo foi efetiva ao utilizar uma família quase de distribuição de erros (deviance explicada = 80,6%). O efeito aleatório não demonstrou significância ($P = 0,433$), similar ao observado para o CCS.

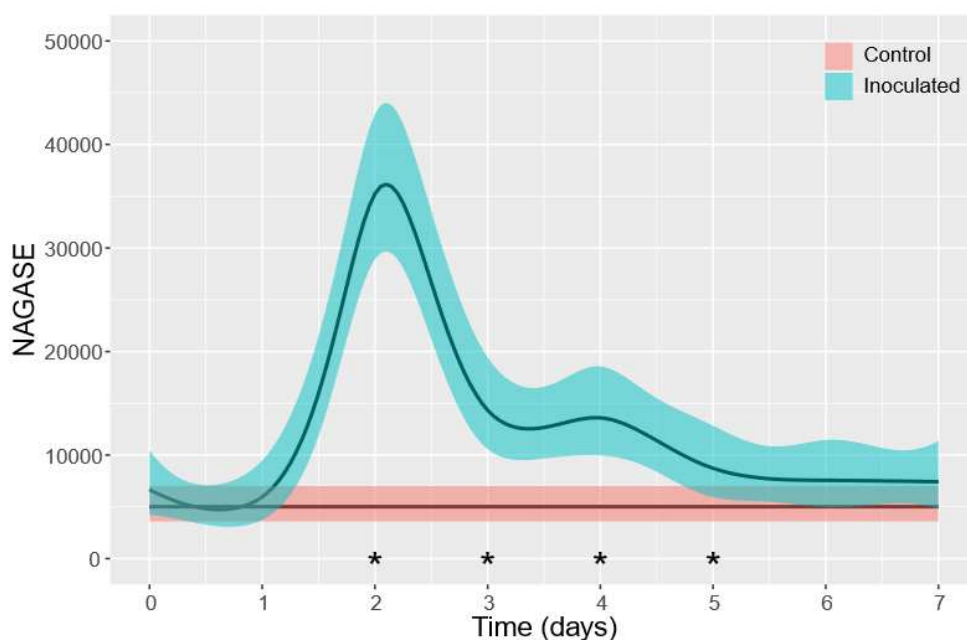


Figura 1. Médias marginais temporais de NAGase estimadas por meio de um modelo aditivo generalizado. Asteriscos na base do gráfico indicam diferenças significativas entre a cabra controle e as cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* usando o método de Sidak ($P < 0,05$). Sombras coloridas ao redor das linhas de tendência representam intervalos de confiança de 95%.

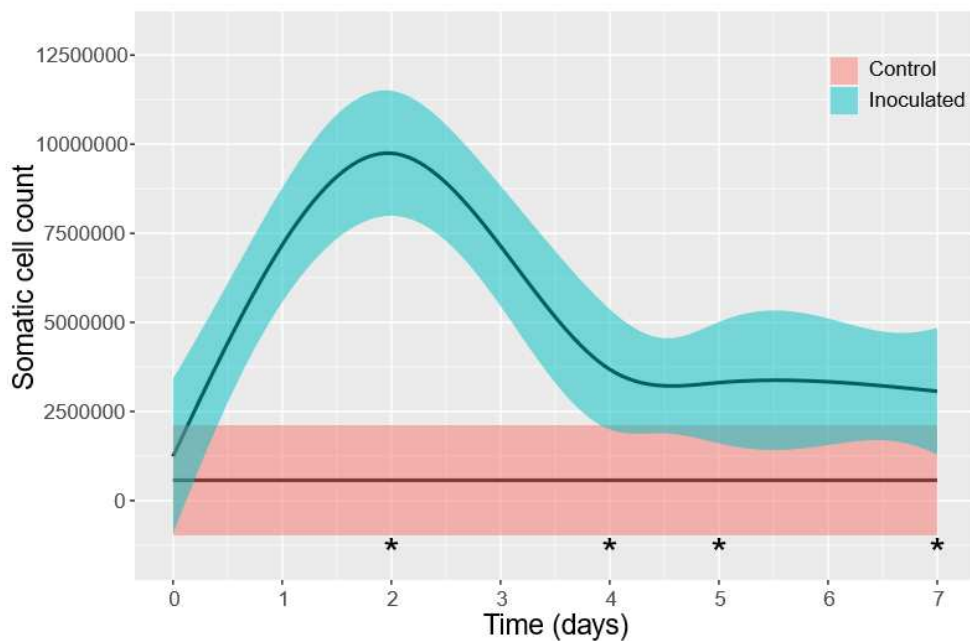


Figura 2. Médias marginais temporais da contagem de células somáticas estimadas por meio de um modelo aditivo generalizado. Asteriscos na base do gráfico indicam diferenças significativas entre a cabra controle e as cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* usando o método de Sidak ($P < 0,05$). Sombras coloridas ao redor das linhas de tendência representam intervalos de confiança de 95%.

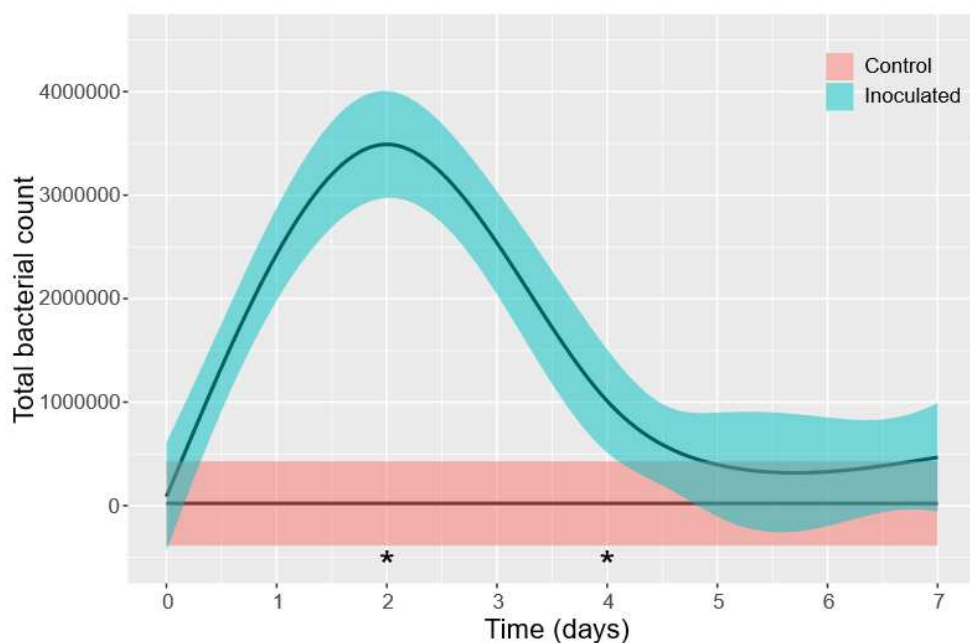


Figura 3. Um modelo aditivo generalizado estima as médias marginais temporais da contagem total de bactérias. Asteriscos na base do gráfico indicam diferenças significativas entre a cabra controle e as cabras inoculadas com *Staphylococcus warneri* usando o método de Sidak ($P < 0,05$). Sombras coloridas ao redor das linhas de tendência representam intervalos de confiança de 95%.

3.3.2. Animais de campo

Dos 49 indivíduos avaliados, 34 foram identificados como mastíticos com base no limiar de CCS estabelecido, conforme detalhado na Tabela 1. Observou-se que o nível de CCS nas cabras mastíticas foi elevado, apresentando uma magnitude 37,81 vezes superior em comparação com as cabras não mastíticas. Em contraste, ao analisar a atividade de NAGase, a diferença entre os grupos foi menos acentuada, com uma média de 10,21% superior nos animais mastíticos (tabela 1). Ao examinar a variação dos valores entre o máximo e mínimo, tanto para CCS quanto para NAGase, verificou-se uma maior amplitude nas cabras mastíticas. Entretanto, o erro padrão foi maior na CCS para as cabras mastíticas. A correlação de Pearson (0,63) revelou uma associação linear moderada e significativa ($df = 47$, $t = 5,5387$, $P < 0,0001$) entre os níveis de NAGase e CCS.

A Figura 4 demonstra o algoritmo de árvore de decisão que reconheceu um ponto de corte na atividade de NAGase ($4,04 = \log_{10}(10943,85 \text{ pmoles de 4-MU/min}/\mu\text{l de leite})$) que separa animais saudáveis e animais com mastite subclínica moderada ++, dos animais com mastite clínica e mastite subclínica leve +.

Foram encontrados dois pontos de corte na CCS que separam os animais saudáveis dos animais subclínicos ++ e os animais subclínicos + dos animais clínicos, que foram, respectivamente, 6,32 ($\log_{10}(2071715 \text{ células/ml})$) e 6,39 ($\log_{10}(2448950 \text{ células/ml})$). Com esse conjunto de pontos de corte, o modelo reconheceu com sucesso os diferentes níveis de mastite na população de cabras do campo, sem nenhum indivíduo classificado incorretamente na fase de teste do modelo estatístico.

Tabela 1. Parâmetros descritivos da atividade de NAGase e da contagem de células somáticas (CCS) de caprinos considerados mastíticos ou não mastíticos pelo valor de limiar de CCS (2.000.000 células/ml, Souza et al. 2012).

Parâmetros	CCS > 2000000				CCS < 2000000			
	CCS		NAGase		CCS		NAGase	
	Normal	log10	Normal	log10	Normal	log10	Normal	log10
Média	17202029	7.0291	15571.89	4.0113	4548667	5.3529	14128.86	4.0019
Erro padrão	3360407	0.0729	2555.48	0.0704	145807	0.1385	3351.21	0.0947
Min	2192000	6.3408	1663.09	3.2209	40000	4.6021	2500.89	3.3981
Max	98452000	7.9932	57405.06	4.7590	1958000	6.2918	44709.31	4.6504
Amplitude	96260000	1.6523	55741.97	1.5380	1918000	1.6897	42208.43	1.2523
(n)*	34	34	34	34	15	15	15	15

*(n) representa o número de animais considerados mastíticos ao aplicar o limiar de CCS.

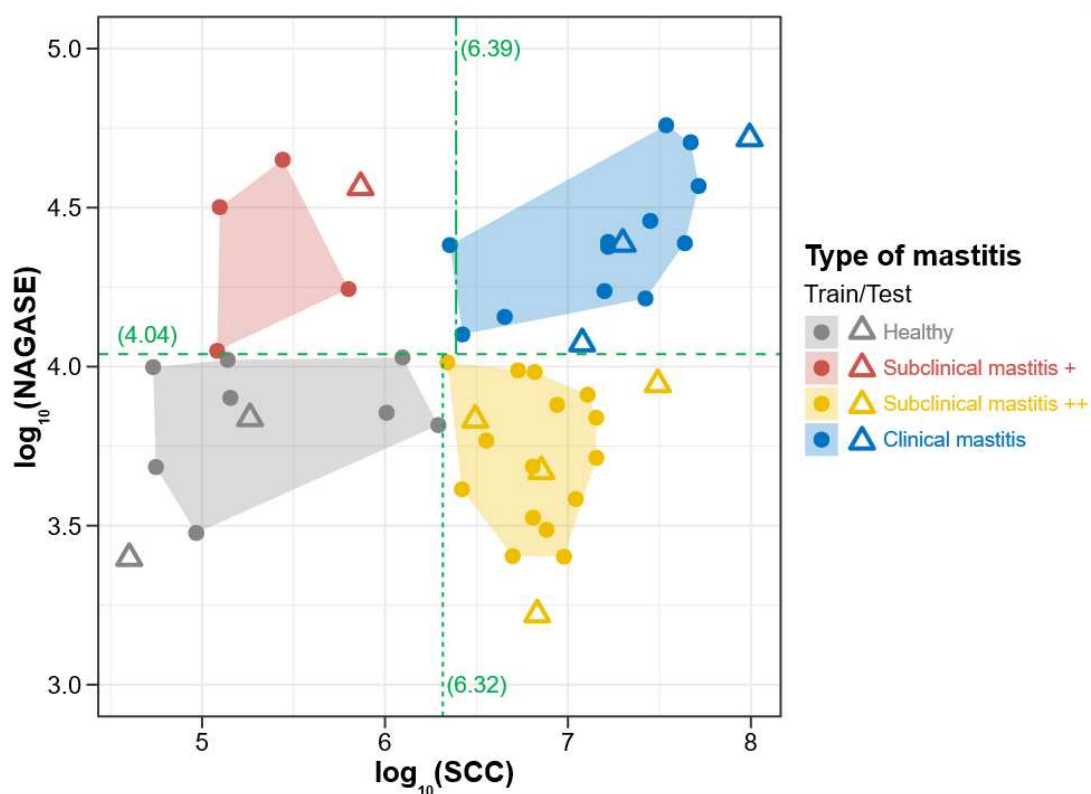


Figura 4. População de caprinos de campo em relação aos valores (logarítmicos) da atividade da NAGase e da contagem de células somáticas (CCS) observados no leite. O gráfico também mostra o resultado do treinamento e do teste de um modelo de árvore de decisão com 80% e 20% dos dados, respectivamente. Dessa forma, diferentes linhas tracejadas verdes indicam o(s) ponto(s) de corte em cada variável encontrados no treinamento do modelo de árvore de decisão. Pontos circulares dentro de cada polígono sombreado indicam os caprinos que participaram da população de treinamento. Pontos triangulares indicam os indivíduos que participaram da população de teste (validação).

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Infecção experimental

A NAGase, uma enzima lisossomal presente no leite, serve como indicador de inflamação na glândula mamária devido à sua origem em células fagocíticas, principalmente neutrófilos (Novac and Andrei, 2020). Neste estudo, observamos um aumento significativo na atividade da NAGase após IMI, conforme ilustrado na Figura 1.

Os achados do nosso estudo se alinham com pesquisas anteriores. Leitner et al. (2004) analisaram 500 amostras de leite caprino de diversos rebanhos e identificaram uma correlação marcante entre o estado bacteriológico do úbere e a atividade de NAGase. Além disso, Barth et al. (2010) constataram que a infecção intramamária impactou significativamente a atividade da NAGase em 58 amostras de leite de cabra, ao investigarem a influência da infecção nos parâmetros do leite. Estudos adicionais também demonstraram uma atividade significativamente mais elevada de NAGase em amostras de leite de úbere infectado em cabras em diferentes estágios de lactação em comparação com a metade não infectada do úbere (Stuhr et al., 2013; Kumar et al., 2019).

Assim, os resultados encontrados em nosso estudo reforçam o potencial da NAGase como uma ferramenta eficaz para monitorar a saúde mamária em cabras, permitindo diferenciar animais infectados de não infectados inclusive nos estágios iniciais da infecção.

As infecções intramamárias aumentam o influxo de leucócitos sanguíneos, principalmente neutrófilos, que são atraídos pela quimiotaxia para combater o patógeno envolvido na infecção. Esses leucócitos também contribuem significativamente para o aumento da CCS no leite secretado, que é o indicador mais amplamente utilizado da saúde da glândula mamária em bovinos, ovinos e caprinos. No entanto, a interpretação da CCS em cabras pode ser difícil devido a vários fatores fisiológicos que influenciam o aumento na contagem dessas células (Jimenez-Granado et al., 2014; Novac and Andrei, 2020; Margatho et al., 2021).

Observamos que durante o desenvolvimento da infecção experimental em nosso estudo, houve um aumento significativo na CCS após a inoculação (Figura

2), confirmando o recrutamento de células do sistema imunológico para o local da infecção e apoiando os resultados obtidos para a NAGase.

Embora o limiar preciso da contagem de CCS para detectar mastite em cabras leiteiras não esteja claramente definido, estudos têm consistentemente indicado uma elevação significativa nas contagens de células quando a glândula mamária está infectada (Leitner et al., 2004; Koop et al., 2012; Stuhr et al., 2013; Kumar et al., 2019), corroborando com nossos achados conforme ilustrado na Figura 1.

Ainda que o uso primário da CCS para diagnóstico de mastite em cabras possa ter suas limitações, ele continua sendo o método predominante na prática (Koop et al., 2012; Margatho et al., 2021), mesmo que sua interpretação seja desafiadora. Contudo, em ambientes controlados, com minimização de variáveis biológicas, como evidenciado em nossa pesquisa, a CCS emerge como um parâmetro confiável para indicar a infecção.

A contagem de placas bacterianas é o método convencional para determinar a presença de bactérias no leite, fornecendo informações sobre células viáveis e sua multiplicação. No entanto, devido ao tempo necessário para realizar essa técnica, métodos mais rápidos, como a citometria de fluxo, ganharam popularidade nos laboratórios de análise de leite para determinar a contagem total de bactérias (CBT) em cabras e ovelhas (De Garnica et al., 2013; Koop et al., 2010; Sierra et al., 2009).

Em nosso estudo, utilizamos a CBT como um parâmetro para monitorar o status bacteriológico dos animais. Observamos um pico de células bacterianas no segundo dia após a infecção (Figura 3), que coincidiu com o momento das outras análises. Essa descoberta sugere fortemente que o aumento da NAGase e da CCS foi principalmente devido à proliferação de bactérias (Figuras 1 e 2).

A relação entre infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativo (CNS) e CCS não está bem estabelecida na literatura. A maioria dos estudos foi conduzida em rebanhos de campo, onde fatores fisiológicos influenciam fortemente a variação na contagem de células. Portanto, é importante considerar esses fatores ao avaliar a relação entre a presença de CNS e CCS em cabras (Gosselin et al., 2019).

No entanto, em nosso estudo, que consistiu em uma infecção experimental em um ambiente controlado, com todos os animais sujeitos ao

mesmo manejo e condições, foi possível observar que uma infecção intramamária causada por um patógeno CNS influenciou fortemente as alterações nos parâmetros do leite, como CCS e NAGase.

3.4.2. Animais de campo

Nossos dados em animais de campo demonstram pontos de corte com valor de Log_{10} de 6,39 (2.448.950 células/ml), sugerindo que valores mais elevados de CCS podem ser usados para distinguir animais mastíticos dos saudáveis. Vários estudos sugerem que valores mais elevados que os pontos de corte definidos de CCS são mais apropriados para diferenciar animais com e sem mastite (Souza et al., 2012; Jimenez-Granado et al., 2014). Em conformidade com isso, nossos dados de infecção experimental sobre CCS (Figura 2) mostraram que os animais apresentaram níveis crescentes acima do ponto de corte de 2.000×10^3 células/ml.

Em um estudo realizado por Min et al. (2007), que examinou infecções intramamárias subclínicas e seu impacto na composição do leite em 35 cabras, foram relatados valores de CCS variando de 2.000 a 4.000×10^3 células/ml em cabras infectadas. No entanto, eles não conseguiram correlacionar precisamente a infecção intramamária com o aumento da CCS. Isso destaca a complexidade da interpretação da CCS em cabras e a influência de diversos fatores nas leituras de CCS.

Ao analisar o leite de 200 cabras leiteiras de diferentes rebanhos, Kumar et al. (2019) encontraram valores médios de CCS e $\text{Log}_{10\text{CCS}}$ significativamente mais elevados nas metades de úbere infectadas (CCS = $3619,63 \pm 35$, $\text{Log}_{10\text{CCS}}$ = $6,31 \pm 0,05$) em comparação com as metades de úbere não infectadas (CCS = $1422,15 \pm 17$, $\text{Log}_{10\text{CCS}}$ = $5,67 \pm 0,03$), o que está alinhado com os valores observados em nosso estudo ao distinguir animais mastíticos de não mastíticos. Isso sugere que valores mais elevados de CCS podem de fato ser indicativos de infecção mamária em cabras leiteiras.

Um estudo recente de Nagahata et al. (2022), que investigou 62 cabras, observaram que amostras de leite com CCS entre $301-1000 \times 10^3$ e $>1010 \times 10^3$ células/ml apresentaram maior positividade bacteriológica do que aquelas com $\text{CCS} < 300 \times 10^3$. Esse resultado sugere que valores elevados de CCS podem estar associados à presença de infecção intramamária.

Não podemos descartar os efeitos das flutuações sazonais e do estágio de lactação para os valores mais baixos de CCS encontrados na literatura (Stuhr et al., 2013). Como mostrado na Figura 4, animais subclínicos + podem ser classificados erroneamente como saudáveis se apenas o parâmetro CCS for considerado, demonstrando que esse parâmetro isoladamente não é confiável. É importante levar em conta múltiplos fatores e realizar uma avaliação abrangente para a detecção precisa de mastite em cabras.

A definição de um valor limite para a atividade da NAGase na literatura é desafiadora devido à variação nas unidades de medida nos estudos existentes, embora muitos empreguem testes fluorométricos para essa avaliação. Contudo, estudos indicam um aumento significativo na atividade da NAGase em cabras com infecções na glândula mamária em diferentes estágios de lactação (Leitner et al., 2004; Barth et al., 2010; Stuhr et al., 2013; Kumar et al., 2019; Nagahata et al., 2022). Essa constatação ressalta o potencial da NAGase como um indicador valioso também em cabras infectadas naturalmente. Portanto, há uma necessidade evidente de estabelecer um método padronizado e eficaz para sua utilização, e nosso estudo contribui com uma abordagem prática e eficiente nesse contexto.

Por fim, ao analisar a Figura 4, é evidente que avaliar os animais usando apenas um parâmetro, seja NAGase ou CCS, apresenta limitações na diferenciação dos grupos, especialmente devido à proximidade dos pontos de corte da CCS. No entanto, a combinação dos parâmetros NAGase e CCS proporciona uma distinção mais clara entre os grupos. Animais saudáveis se distinguem por valores mais baixos tanto de CCS quanto de NAGase, enquanto aqueles com mastite clínica exibem níveis elevados desses parâmetros. Essa integração dos dados destaca a importância da análise combinada para um diagnóstico mais acurado de mastite em cabras leiteiras.

3.5. CONCLUSÃO

A enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase é expressa em quantidades maiores no leite de cabras experimentalmente infectadas com *S. warneri*. A combinação de NAGase com a CCS fornece um diagnóstico mais preciso e diferencial de animais naturalmente infectados em diferentes estágios de mastite, o que pode ser útil na prevenção e tratamento da mastite caprina.

3.6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil) e da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira possui bolsa de produtividade do CNPq.

3.7. REFERÊNCIAS

Albenzio M, Santillo A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research* 2011;101:33–40. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2011.09.023>.

Barth K, Aulrich K, Müller U, Knappstein K. Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Ruminant Research* 2010;94:161–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.022>.

Bernier Gosselin V, Dufour S, Adkins PRF, Middleton JR. Persistence of coagulase negative staphylococcal intramammary infections in dairy goats. *Journal of Dairy Research* 2019;86:211–6. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000311>.

Chagunda, M. G. G., Larsen, T., Bjerring, M., & Ingvartsen, K. L. (2006). L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 431–440. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001956>

Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2007;68:145–53. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.011>.

Dimitrov D, Stoimenov G, Morrison O. Diagnosis of subclinical mastitis in dairy goats (Review). *Journal of Medical and Dental Practice* 2018;5:702–7. <https://doi.org/10.18044/medinform.201851.702>.

Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *Int Dairy J* 2006;16:500–16. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2005.09.013>.

De Garnica ML, Linage B, Carriedo JA, De La Fuente LF, García-Jimeno MC, Santos JA, et al. Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. *J Dairy Sci* 2013;96:1021–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5915>.

Gocmen H, Darbaz I, Ergene O, Esendal OM, Aslan S. The relationships between somatic cell count, total bacterial count and intramammary infection in milk samples of Damascus goats during postpartum days. *Small Ruminant Research* 2019;180:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.09.018>.

Gosselin VB, Lovstad J, Dufour S, Adkins PRF, Middleton JR. Use of MALDI-TOF to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats. *J Dairy Sci* 2018;101:6262–70. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14224>.

Hovinen M, Simojoki H, Pösö R, Suolaniemi J, Kalmus P, Suojala L, et al. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *Journal of Dairy Research* 2016;83:219–27. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000224>.

Jimenez-Granado R, Sanchez-Rodriguez M, Arce C, Rodriguez-Estevez V. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2014;12:133–50. <https://doi.org/10.5424/sjar/2014121-3803>.

Koop G, Dik N, Nielen M, Lipman LJA. Short communication: Repeatability of differential goat bulk milk culture and associations with somatic cell count, total

bacterial count, and standard plate count. *J Dairy Sci* 2010;93:2569–73. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2705>.

Koop G, De Vliegher S, De Visscher A, Supré K, Haesebrouck F, Nielen M, et al. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *J Dairy Sci* 2012;95:5075–84. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-5615>.

Kumar R, Gupta DK, Bansal BK, Singh RS. Alterations in udder health indicators in goats with intramammary infection. *Indian J Vet Med* 2019;39:22–6.

Leitner G., Merin U, Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci* 2004;87:1719–26. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73325-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73325-1).

Leitner Gabriel, Merin U, Silanikove N, Ezra E, Chaffer M, Gollop N, et al. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats' milk. *Journal of Dairy Research* 2004;71:311–5. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000305>.

Leitner G, Silanikove N, Merin U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* 2008;74:221–5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.02.009>.

Maisi P. Analysis of physiological changes in caprine milk with CMT, NAGase and antitrypsin. *Small Ruminant Research* 1990;3:485–92. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(90\)90079-L](https://doi.org/10.1016/0921-4488(90)90079-L).

Margatho G, Quintas H, Rodríguez-Estévez V, Simóes J. Infectious and Non-infectious Factors Affecting Somatic Cell Count and New Diagnostic Approaches of Intramammary Infections in Dairy Goats: A Review. *Current Chinese Science* 2021;1:460–76. <https://doi.org/10.2174/2210298101666210402123549>.

Min BR, Tomita G, Hart SP. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. *J Dairy Res* 2007;74:204–10. <https://doi.org/10.1017/S0022029906002378>.

Moraes Peixoto R, de Moraes Peixoto Araújo R, e Silva Peixoto LJ, Gonçalves Bomfim SA, Guedes da Silva TM, Sarmento Silva TM, et al. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. *Small Ruminant Research* 2015;130:229–35. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2015.07.009>.

Nagahata H, Fuse M, Umehara K, Gondaira S, Higuchi H, Hisaeda K, et al. Evaluation of the health status of mammary glands and compositional changes in udder-half milk obtained from dairy goats for milk quality management. *Anim Sci J* 2022;93:e13714. <https://doi.org/10.1111/asj.13714>.

Nagargoje, S. D., Somagond, Y. M., Panda, B. S. K., & Dang, A. K. (2023). Enzymes in mastitis milk. *Enzymes Beyond Traditional Applications in Dairy Science and Technology*, 37–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96010-6.00002-3>

Nirala NR, Shtenberg G. N-acetyl- β -D-glucosaminidase biomarker quantification in milk using Ag-porous Si SERS platform for mastitis severity evaluation. *Appl Surf Sci* 2021;566. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.150700>.

Novac CS, Andrei S. The impact of mastitis on the biochemical parameters, oxidative and nitrosative stress markers in goat's milk: A review. *Pathogens* 2020;9:1–23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110882>.

Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 2003;34:565–78. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003026>.

Ripley B (2022) *tree: Classification and Regression Trees*.

Shalev-Shwartz S, Ben-David S (2014) Understanding machine learning: From theory to algorithms. Cambridge University Press.

Sierra D, Sánchez A, Contreras A, Luengo C, Corrales JC, de la fe C, et al. Short communication: Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. *J Dairy Sci* 2009;92:4841–5. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1988>.

Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research* 2012;107:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.005>.

Stuhr T, Aulrich K, Barth K, Knappstein K, Larsen T. Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research* 2013;111:139–46. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.004>.

Team RC (2022) A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022.

Wang YM, Ma YQ, Bi SC, Ma XD, Guan R, Wang SH, et al. Therapeutic effect of ginsenoside Rg1 on mastitis experimentally induced by lipopolysaccharide in lactating goats. *J Dairy Sci* 2019;102:2443–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15280>.

Wickham H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. 2nd ed. New York: Springer; 2016.

Wickham H, Averick M, Bryan J, et al (2019) Welcome to the {tidyverse}. *Journal of Open Source Software* 4:1686. doi: 10.21105/joss.01686

Wood SN. *Generalized additive models: An introduction with R*, second edition. *Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition* 2017:1–

476. <https://doi.org/10.1201/9781315370279/GENERALIZED-ADDITIVE-MODELS-SIMON-WOOD>.

Wood SN, Pya N, Säfken B. Smoothing Parameter and Model Selection for General Smooth Models. *J Am Stat Assoc* 2016;111:1548–63. https://doi.org/10.1080/01621459.2016.1180986/SUPPL_FILE/UASA_A_1180986_SM0752.PDF.

3.8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar S1: Médias marginais estimadas da atividade de (NAGase) avaliada ao longo do tempo da infecção experimental em caprinos por *Staphylococcus warneri*.

Treatment	Time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	5017 ± 834 a	5017 ± 834 a	5017 ± 834 b	5017 ± 834 b	5017 ± 834 b	5017 ± 834 b	5016 ± 834 a	5016 ± 834 a
Inoculate	6666 ± 1490	5958 ± 1380	35235 ± 3459	14333 ± 2169	13598 ± 2110	8728 ± 1674	7562 ± 1564	7426 ± 1574
d	a	a	a	a	a	a	a	a

Different letters indicate significant differences by sidak method ($P < 0.05$)

Tabela Suplementar S2: Médias marginais estimadas da Contagem de células somáticas (CCS) avaliada ao longo do tempo da infecção experimental em caprinos por *Staphylococcus warneri*.

Treatment	Time (days)				
	0	2	4	5	7
Control	571624 ± 788567 a	571624 ± 788540 b	571625 ± 788529 b	571625 ± 788529 b	571626 ± 788541 b
Inoculated	1240579 ± 1110684 a	9746450 ± 895066 a	3683105 ± 861165 a	3310432 ± 868888 a	3067765 ± 907620 a

Different letters indicate significant differences by sidak method ($P < 0.05$)

Tabela Suplementar S3: Médias marginais estimadas da Contagem bacteriana total (CTB) avaliada ao longo do tempo da infecção experimental em caprinos por *Staphylococcus warneri*.

Treatment	Time (days)				
	0	2	4	5	7
Control	21800 ± 200233 a	21800 ± 200231 b	21800 ± 200231 b	21800 ± 200231 a	21800 ± 200233 a
Inoculated	87468 ± 257839 a	3491131 ± 254331 a	1010960 ± 245149 a	396216 ± 247248 a	467359 ± 257716 a

Different letters indicate significant differences by sidak method ($P < 0.05$)

4. CAPÍTULO 3:

Mastite caprina e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Jéssica Lobo Albuquerque Caldeira¹ Daiene Gaione Costa¹ Maria Eduarda Gomes do Rêgo¹
Richard Costa Polveiro¹ Wagner Faria Barbosa² Maria Aparecida Scatamburlo Moreira¹

¹ Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

² Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

* Corresponding author:

Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, avenida PH Rolfs, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.
masm@ufv.br

RESUMO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária com repercussões na produção e na qualidade de leite em rebanhos leiteiros. *Staphylococcus* spp. são os patógenos mais frequentemente associados à mastite clínica e subclínica em caprinos. Neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa contra infecções e inflamações, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Em casos de mastite, essas células migram para o leite e utilizam diversas estratégias. Além disso, os neutrófilos são capazes de liberar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), estruturas compostas por DNA, histonas e proteínas bactericidas que capturam patógenos e limitam sua disseminação. Este estudo investigou se há a liberação de NETs por neutrófilos caprinos estimulados *in vitro* por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus warneri*, dois patógenos comuns da mastite caprina. Sangue de cabras adultas saudáveis foram coletados e utilizados no isolamento de neutrófilos polimorfonucleares caprino (PMNs). Avaliamos a formação NETs caprinos induzindo as células sob quatro estímulos: forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), como controle positivo, citocalasina para inibição da polimerização de actina, *S. warneri* e *S. aureus*. Controle negativo contendo apenas PMNs também foi realizado. Os dados foram submetidos a análise estatística. Os resultados demonstraram que os neutrófilos caprinos foram capazes de formar NETs em resposta à estimulação química e à presença das bactérias estudadas. As NETs capturaram eficazmente os patógenos, indicando que os neutrófilos caprinos têm a capacidade de aprisionar esses invasores através desse mecanismo. Esses achados sugerem que, além da fagocitose clássica, a formação de NETs pode ser um mecanismo complementar importante na defesa contra a mastite em caprinos. Os resultados indicam que há diferenças entre *S. warneri* e *S. aureus* e estes podem induzir níveis variados de formação de NETs, destacando a importância de considerar as características individuais dos patógenos. Em conclusão, este estudo demonstra um mecanismo de defesa celular contra a mastite em caprinos, através da formação de NETs em resposta à presença de *S. aureus* e *S. warneri*, sendo um dado inédito na literatura.

Palavras-chave: Ruminantes. Neutrófilos. *Staphylococcus* spp.

4.1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma condição inflamatória da glândula mamária que pode levar a várias alterações, dependendo do patógeno causador, da gravidade das lesões e dos danos ao parênquima do úbere. Se apresenta de forma clínica e subclínica e ambas são importantes nos rebanhos caprinos leiteiros devido ao impacto negativo na produção e qualidade do leite afetando inclusive a disponibilidade para o consumo humano (Rainard, Foucras, et al., 2018; Xie et al., 2021).

No rebanho caprino, a mastite subclínica apresenta uma incidência que pode superar 30%, enquanto a forma clínica é menos comum, com incidência inferior a 5%. Vale ressaltar que, frequentemente, os casos clínicos em cabras exibem sintomas mais severos em comparação com os observados em bovinos (Kahinda & Kahinda, 2021).

Vários patógenos podem causar mastite, mas *Staphylococcus* spp. são os micro-organismos causais mais frequentemente isolados em infecções intramamárias em caprinos e ovinos (Contreras et al., 2007; Nelli et al., 2022).

A mastite subclínica é predominantemente causada por estafilococos coagulase-negativos (SCN), considerados menos patogênicos. Alguns desses SCN comumente isolados são *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus warneri* (Andrade et al., 2021; Rosa et al., 2022; Salaberry et al., 2015). Por outro lado, a mastite clínica é principalmente causada por *Staphylococcus aureus*, que resulta geralmente em mastite clínica aguda (Contreras et al., 2007; Kahinda & Kahinda, 2021).

Os neutrófilos desempenham um papel crucial na defesa contra doenças inflamatórias causadas por infecções e problemas metabólicos. Eles são a primeira linha de defesa contra patógenos prejudiciais, como aqueles responsáveis por mastite, metrite e infecções parasitárias. Em casos de mastite, os neutrófilos se deslocam do sangue para o leite e utilizam diversas estratégias, incluindo reações químicas oxidativas e não oxidativas, para combater e destruir os patógenos invasores (Kobayashi et al., 2005; Swain et al., 2014; Worku et al., 2021).

A fagocitose é a principal maneira pela qual os neutrófilos eliminam os *Staphylococcus* spp. A rápida chegada dos neutrófilos às áreas infectadas da glândula mamária é vital, auxiliada por opsoninas (anticorpos e complemento), bem como citocinas provenientes de várias células imunológicas, incluindo as mieloides e linfoides, que fortalecem a resposta dos neutrófilos no sistema de defesa. A importância desse sistema de defesa é evidenciada pela variedade de fatores estafilocócicos projetados para combatê-lo, tais como exopolímeros, proteína estafilocócica A, alfa-toxina, leucotoxinas e outros componentes (Rainard, Foucras, et al., 2018).

Brinkmann et al. (2004) identificaram pela primeira vez a formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) como um processo regulado de liberação da cromatina nuclear. Essa descoberta sugere um papel fisiologicamente benéfico das NETs na defesa do hospedeiro, a qual vem sendo extensivamente estudada nos últimos anos (Boeltz et al., 2019). Essas estruturas, produzidas por neutrófilos ativados em um processo de morte celular não apoptótica, compreendem uma combinação de DNA, cromatina revestida com histonas e várias proteínas, incluindo mieloperoxidase (MPO) e elastase de neutrófilos (NE), que possuem propriedades antimicrobianas e de permeabilidade (Halverson et al., 2015). As NETs possuem um impacto na evolução de várias doenças infecciosas, assim como a mastite (Grinberg et al., 2008; Ravindran et al., 2019).

As NETs têm a capacidade de capturar patógenos ao se ligarem à sua superfície, limitando e confinando esses patógenos a regiões específicas de infecção. Esse processo ajuda a evitar sua disseminação para diferentes tecidos através da corrente sanguínea periférica (Seeley et al., 2012).

Foi demonstrado que as NETs desempenham um papel no processo de eliminação de patógenos na glândula mamária, com pesquisas que demonstram que tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas relacionadas à mastite estão ligadas às NETs em bovinos (Lippolis et al., 2006; Grinberg et al., 2008; Swain et al., 2014; Wei et al., 2019) e em ovinos (Pisanu et al., 2015; Cacciotto et al., 2016).

Apesar do sistema imune inato, particularmente os neutrófilos, desempenhar um papel crucial na saúde da glândula mamária, o envolvimento

preciso das NETs na resposta imunológica contra a mastite ainda não foi completamente elucidado (Xie et al., 2021).

A capacidade dos neutrófilos caprinos de formar armadilhas extracelulares (NETs) tem sido pouco explorada, com foco limitado em parasitoses (Silva et al. 2014). A interação de NETs com patógenos responsáveis pela mastite em caprinos permanece inexplorada, sublinhando uma lacuna no entendimento para aprimoramento do manejo sanitário desses animais.

Assim, neste estudo objetivamos examinar se há a liberação de armadilhas extracelulares (NETs) por neutrófilos de caprinos quando submetidos a estímulos *in vitro* por *S. aureus* e *S. warneri* associados à mastite nestes animais.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV sob o número 62/2018.

4.2.1. Preparo bacteriano

Utilizamos dois representantes de bactérias responsáveis pela mastite em caprinos para analisar a indução da formação de NETs por neutrófilos desses animais. No grupo SCN, empregamos um isolado de *Staphylococcus warneri* obtido de um caso de mastite subclínica persistente em cabras. Esse isolado foi identificado com base em características microbiológicas e genéticas, e demonstrou possuir múltiplos genes de virulência (França, 2021 – dados não publicados). Como representante de *Staphylococcus aureus*, utilizamos a cepa ATCC 33591 (<https://www.atcc.org/products/33591>), que possui vários genes de resistência.

Os isolados foram plaqueados em ágar Brain Heart Infusion (BHI) para conferir a pureza e, em seguida, cultivados em caldo BHI *over night* a 37 °C em estufa bacteriológica. A concentração dos isolados foi ajustada por espectrofotômetro para 2×10^7 UFC/mL, a fim de serem utilizados nas análises subsequentes.

4.2.2. Isolamento de neutrófilos polimorfonucleares caprino

O isolamento foi realizado de acordo com Silva et al., (2014), com algumas modificações. Foram coletados 20 ml de sangue de quatro cabras adultas clinicamente saudáveis, por meio da punção da veia jugular, em tubos contendo lítio-heparina como anticoagulante. O sangue heparinizado foi diluído, sob condições estéreis, em uma quantidade igual de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,02% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Em seguida, foi cuidadosamente colocado em 3 ml de solução de separação Ficoll paque® e centrifugado a $800 \times g$ por 45 min. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspendidas na proporção de 1 ml de solução celular para 10 ml de tampão de lise de células vermelhas (Cloreto de Amônio 0,155 M, Bicarbonato de sódio 0,12 M, EDTA 0,0001 M) e homogeneizadas por inversão lenta durante 1 minuto para lisar os eritrócitos. A osmolaridade foi reajustada pela adição de 5 ml de Hanks' Balanced Salt solution. Os PMNs caprinos foram lavados duas vezes (10 min, $400 \times g$, 4 °C) em meio RPMI 1640 e ressuspendidos no mesmo meio. A visualização das células PMNs foi possível por meio do esfregaço das células obtidas ao final do processo de isolamento e coloração com Panótico Rápido. A viabilidade foi avaliada pela exclusão do corante azul de Trypan.

4.2.3. Formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos *in vitro*

A concentração de PMNs caprino foi ajustada para $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ em meio RPMI 1640. As células foram semeadas em lamínulas de vidro redondas estéreis de 13 mm, colocadas dentro dos poços das placas de cultura de 24 poços e incubada por 1 h, a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (Rebordão et al., 2014).

Após esse período, avaliamos a formação de armadilhas extracelulares em neutrófilos caprinos induzindo as células sob os seguintes estímulos: (a) 100nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) um forte indutor de NETs, como controle positivo; (b) citocalasina (Cyt, 10 µg/ml; Sigma-Aldrich) que impede a polimerização da actina (c) *Staphylococcus warneri* e (d) *Staphylococcus aureus*. Um controle negativo contendo apenas PMNs também foi realizado.

Após incubação, as lamínulas de vidro contendo os PMNs foram lavadas três vezes em PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%. Em seguida, os NETs foram fixados com paraformaldeído a 4% por 1 hora. As amostras foram coradas com DAPI a 300 nM durante 15 min (Sigma-Aldrich) e observados usando um Fotomicroscópio Monocromático Olympus BX53. As estruturas filamentosas de NETs presentes em cada campo microscópico foram contadas manualmente. Para cada lamínula, foram visualizados dez campos microscópicos com ampliação de 200 \times .

4.2.4. Análises estatísticas

Para demonstrarmos as diferenças entre a presença de *S. warneri* e *S. aureus* entre os demais estímulos na formação de NETs por neutrófilos caprinos algumas análises estatísticas foram realizadas.

Armadilhas extracelulares de neutrófilos por campo (NETs/Field) foram transformadas usando o método BoxCox e submetidas a um modelo linear de efeito misto usando a função “lmer()” do pacote R “lme4” (Bates et al., 2015). O modelo foi ajustado considerando os tratamentos como variáveis explicativas, que englobaram algumas combinações de níveis entre Citocalasina (níveis: Não e Sim [a 10 μ g/mL]), PMA (níveis: Não e Sim [a 100nM]) e bactérias (níveis: *S. aureus*, *S. warneri* e Nenhum). Além disso, o dia da leitura dos dados foi considerado como efeito aleatório. As parcelas de resíduos foram inspecionadas visualmente usando a função “resid_panel()” do pacote R “ggResidpanel” (Goode & Rey, 2019) para verificar a adequação do modelo. A análise de variância tipo III foi realizada utilizando a função “Anova()” do pacote R “car” (Fox & Weisberg, 2019) a 5% de significância. Verificada a significância dos efeitos, as médias foram extraídas do modelo ajustado utilizando a função “emmeans()” do pacote R “emmeans” (Lenth, 2023) e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando a função “cld ()” do pacote “multcomp” (Hothorn et al., 2008). Toda a manipulação e análise dos dados foi realizada em R (R Core Team, 2022).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As NETs consistem em uma estrutura de rede externa, liberada por neutrófilos que sofreram algum tipo de estimulação (Grob et al., 2020; Swain et al., 2014). Na microscopia de fluorescência podemos observar a formação de estruturas filamentosas semelhantes à descrita na literatura, tanto por estimulação química quanto por bactérias, como demonstrado na figura 1.

As NETs têm a capacidade essencial de capturar e restringir patógenos em sua superfície, impedindo sua disseminação pela circulação sanguínea. Este mecanismo antimicrobiano permite a captura e exposição de patógenos a peptídeos antimicrobianos e enzimas na estrutura da cromatina (Xie et al., 2021). As figuras 1 evidenciam a habilidade dos neutrófilos caprinos em aprisionar *S. aureus* (C) e *S. warneri* (E) nas armadilhas formadas, destacando a eficácia deste mecanismo de defesa.

Em bovinos, a relação entre bactérias associadas à mastite e as NETs tem sido amplamente investigada (Grinberg et al., 2008; Swain et al., 2014). Estudos *in vitro* destacam o papel crucial das histonas nas NETs, evidenciando seu impacto no dano às células epiteliais mamárias (Wei et al., 2019). Estratégias que visam modular a formação excessiva de NETs surgem como promissoras para atenuar lesões teciduais (Vong et al., 2014; Wei et al., 2019). Adicionalmente, observações em bovinos revelaram a formação de NETs tanto em neutrófilos sanguíneos quanto em amostras de leite, sugerindo uma limitação às infecções causadas pelos micro-organismos invasores (Lippolis et al., 2006).

Em ovinos, há estudos que descreveram a formação de NET *in vivo* em leite e em tecidos da glândula mamária tanto por infecção experimental por *Streptococcus uberis* (Pisanu et al., 2015) quanto por infecção natural por *Mycoplasma agalactiae* (Cacciotto et al., 2016). Esses achados indicam a relevância dos NETs como parte do sistema de defesa imunológica dos animais contra a mastite e destacam seu papel na resposta antimicrobiana.

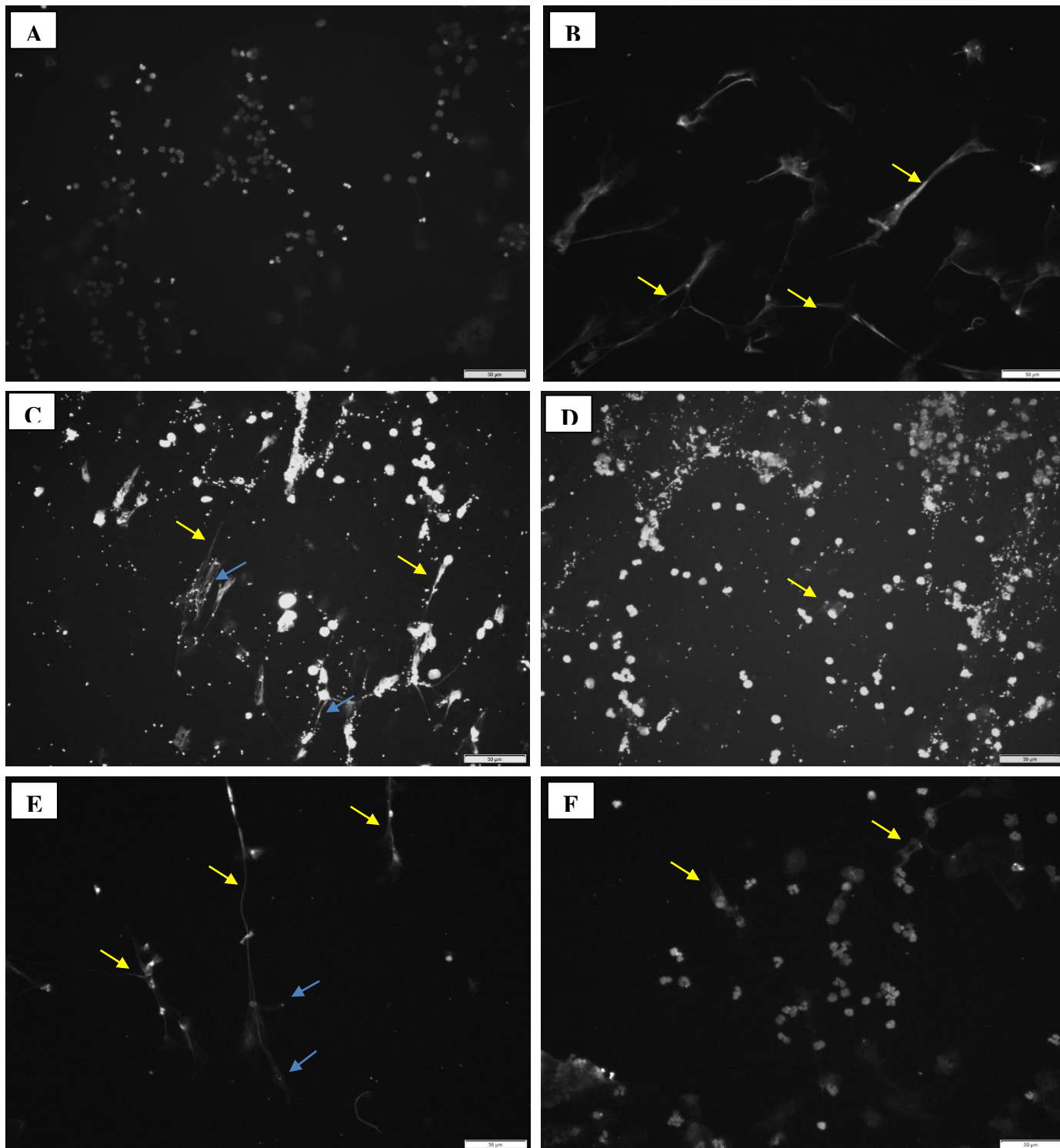


Figura 1. Formação de Neutrophil extracellular traps (NETs) em neutrófilos caprinos. **(A)** Controle negativo, apenas Neutrófilos polimorfinucleares (PMNs) caprino **(B)** Controle positivo, PMNs com adição de 100nM de forbol 12-miristato 13-acetato **(C)** PMNs com adição de 2×10^7 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* **(D)** PMNs com adição de 2×10^7 UFC/mL de *S. aureus* e citocalisina 10µg/ml **(E)** PMNs com adição de 2×10^7 UFC/mL *Staphylococcus warneri* **(F)** PMNs com adição de 2×10^7 UFC/mL de *S. warneri* e citocalisina 10µg/ml. As setas amarelas mostram NETs. As setas azuis indicam *Staphylococcus spp.* presente nas armadilhas. O DNA foi corado utilizando dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e visualizado em microscópio de fluorescência monocromático. A barra indica 50µm.

Em caprinos, a capacidade das células de defesa de formar armadilhas é pouco documentada o que demonstra a importância de estudos nesse contexto. Estudos anteriores, como o de Silva et al. (2014), já apontavam para a formação de NETs por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) em resposta a diferentes estágios do protozoário *Eimeria arloingi*. Esta descoberta foi corroborada por Muñoz-Caro et al. (2016), que identificaram a presença de DNA de neutrófilos, elastase e histonas em tecidos infectados por *Eimeria* spp., reforçando a importância das NETs na resposta imune caprina. Notavelmente, nosso estudo pioneiro agora evidencia a formação de NETs em neutrófilos caprinos induzidos por bactérias causadoras de mastite, ampliando o entendimento sobre a resposta imunológica desses animais a patógenos específicos.

Ao quantificarmos as diferenças na formação de NETs em PMNs caprinos sob diferentes estímulos, a análise de variância revelou impacto notável ($\chi^2 = 160,79$, $gl = 6$, $P < 0,001$) atribuído aos tratamentos nas NETs/Campo. Podemos observar, na figura 2, que os neutrófilos aumentaram significativamente a produção de NETs na presença de *S. aureus* superando todos os demais tratamentos. Já a na presença de *S. warneri* também houve aumento na produção de NETs, assemelhando-se ao controle positivo. Por último, nos casos em que ambas as bactérias foram adicionadas juntamente com citocalasina, a formação de armadilhas pelos PMNs se assemelharam estatisticamente ao controle negativo, demonstrando assim o comprometimento celular causado pela adição da citocalasina.

Este estudo demonstra pela primeira vez que neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) caprinos estimulados têm a capacidade de formar NETs *in vitro* na presença de bactérias causadoras de mastite, como *S. warneri* e *S. aureus*. Tais descobertas ressaltam que os NETs produzidos pelos PMNs caprinos têm potencial para capturar esses patógenos, representando uma via complementar à fagocitose e pode influenciar na resposta imune que se desencadeia nesses animais.

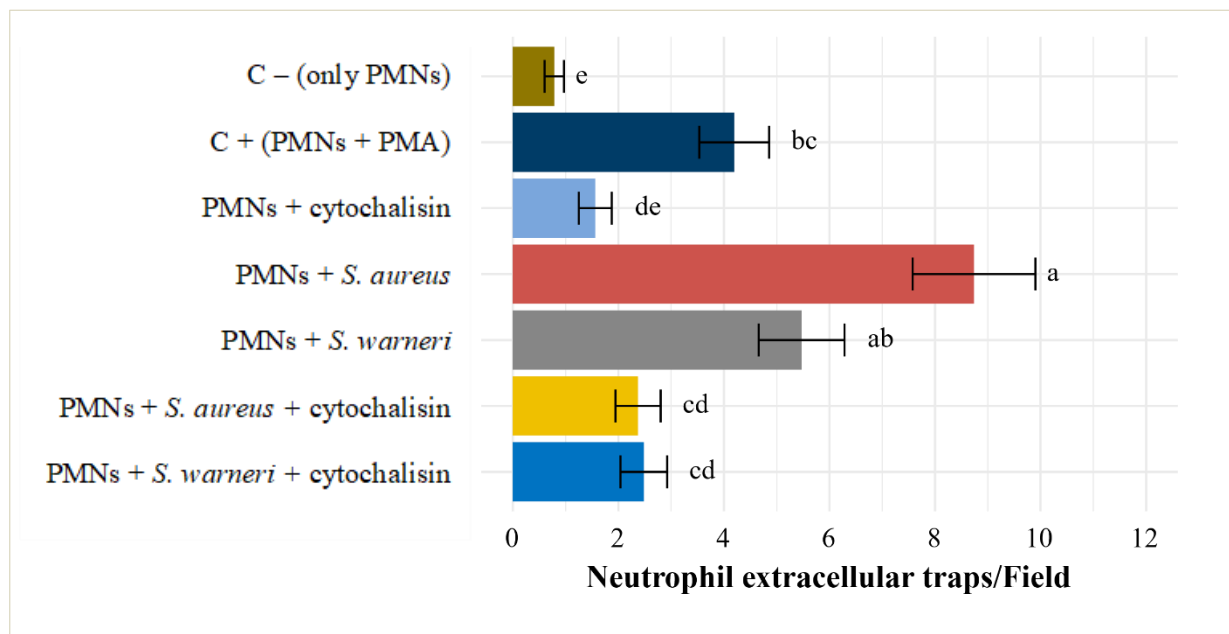


Figura 2. Neutrophil extracellular traps por campo sob influência de citocalisina, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e presença de *Staphylococcus* spp. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Neste estudo, evidenciamos que neutrófilos caprinos, quando estimulados com 100 nM de PMA, produziram NETs, conforme ilustrado nas Figuras 1(B). O PMA funcionou eficazmente como um controle positivo para as células caprinas, dada sua natureza como um potente mitógeno que ativa a proteína quinase C (PKC), com subsequente aumento no cálcio intracelular e ativação da NADPH oxidase, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hakkim et al., 2010; Kaplan & Radic, 2012).

Quando PMNs caprinos foram incubados com citocalasina, a formação de NETs foi comprometida, assemelhando-se ao controle negativo. No entanto, a presença das bactérias foram capaz de estimular a formação de NETs mesmo com o comprometimento celular (Fig. 2). Essa informação ganha relevância ao considerarmos a resposta imunológica aos patógenos na glândula mamária. Estudos anteriores sugeriram que a gordura e as proteínas do leite suprimem as principais funções antibacterianas dos neutrófilos, como a fagocitose e a explosão oxidativa. No entanto, esses componentes não inibem a liberação de NETs por neutrófilos bovinos (Lippolis et al., 2006).

Assim, nosso estudo sugere que, além da fagocitose clássica que é o mecanismo principal pela qual os neutrófilos eliminam os *Staphylococcus* spp., a formação de NETs por essas células pode ser uma alternativa e um mecanismo complementar para caprinos no combate à mastite.

Alguns autores ressaltam que há uma variedade de proteínas e vias envolvidas na formação de NETs em resposta a diferentes estímulos, com ênfase especial no papel da citrulinação nesse processo (Konig & Andrade, 2016). Por exemplo, os neutrófilos humanos que formam NETs em resposta ao PMA, necessitam de PKC, cálcio, ROS, MPO e NE, o que contrasta com a indução de NETs por *S. aureus*. Neste último caso, a formação de NETs depende principalmente da capacidade dos neutrófilos de gerar ROS (Fuchs et al., 2012; Kenny et al., 2017). Assim, compreender essas vias é crucial devido à liberação de cromatina como mecanismo de defesa do hospedeiro, o que já foi identificado tanto em animais quanto em plantas. Isso demonstra a necessidade de uma ampla gama de vias que induzem a formação dessas estruturas (Tran et al., 2016).

A formação de NET induzida por *S. aureus* e *S. warneri* foi responsável por valores maiores do que a estimulação química com PMA em nosso estudo, apontando para uma capacidade considerável de indução de NET das bactérias (Figura 2). Outra característica interessante, é que mesmo utilizando a mesma concentração para ambas as bactérias de 2×10^7 UFC/mL, a multiplicação observada de *S. aureus* foi bem maior do que o isolado de *S. aureus* (Fig 1.) o que também pode ter influenciado na maior indução de NETs.

Em bovinos em infecção natural por *S. aureus*, Swain et al. (2014) demonstraram a formação de NETs como estratégias para combater os patógenos invasores na glândula mamária. *S. aureus* isolados de mastite têm a capacidade de produzir vários exopolímeros de superfície, como polissacarídeos capsulares e poli-N-acetil-b-1,6 glucosamina (PNAG), que estão envolvidos na resistência à fagocitose (Kampen et al., 2005; Pérez et al., 2009; Rainard et al., 2018).

A cepa ATCC 33591 que utilizamos em nosso estudo possui genes para codificação capsular como o *cap8A* além do gene *nuc* que é uma nuclease termoestável que hidrolisa DNA e RNA nas células hospedeiras que também promovem a fuga de microrganismos quando retidos por NETs (Andrade et al.,

2021; Berends et al., 2010), possuindo assim mecanismos de escape a fagocitose e ao próprio aprisionamento e morte por NETs o que pode sugerir a quantidade maior de NETs por *S. aureus* em nosso estudo.

É relevante observar que a superexpressão de NETs também pode resultar em danos às células epiteliais mamárias. Nesse contexto, as histonas desempenham um papel significativo na citotoxicidade induzida por NETs, contribuindo para processos de necrose, piroptose e apoptose dessas células epiteliais (Wei et al., 2019). Dados de outros estudos enfatizam que isolados de *S. aureus* são os principais responsáveis pela mastite gangrenosa em ruminantes leiteiros, incluindo caprinos (Rainard, Gitton, et al., 2018), isso apoia a hipótese levantada por nosso estudo que *S. aureus* induz uma maior formação de NETs do que os outros estímulos aqui estudados, o que pode contribuir para uma resposta celular exacerbada e levar a danos teciduais.

O isolado de *S. warneri* que utilizamos é oriunda de mastite caprina subclínica persistente, que possui genes de resistência que codificam bombas de efluxo, bem como genes de virulência relacionados à adesão celular, lipases e hemolisina. No entanto, não apresenta genes envolvidos em mecanismos de evasão da fagocitose, como os que codificam proteínas capsulares (França, 2021 – dados não publicados).

No contexto da mastite, estudos indicam que a ausência de expressão capsular aumenta a adesão e invasão de células eucarióticas por *S. aureus* (Buzzola et al., 2007; Pohlmann-Dietze et al., 2000; Tuchscher et al., 2005). Além disso, cepas de *E. coli* não encapsuladas, provenientes de vacas com mastite, demonstraram menor resistência à fagocitose por neutrófilos bovinos em comparação com cepas encapsuladas (Hill et al., 1983). Vale mencionar que *S. aureus* sem cápsula foi associado a mastite crônica em camundongos, sugerindo que a ausência de síntese de cápsula pode permitir persistência bacteriana na glândula mamária (Bardiau et al., 2016; Tuchscher et al., 2005), característica compartilhada pelo isolado de *S. warneri* utilizada em nossa pesquisa, onde observamos que o *S. warneri* produziu menos NETs em comparação com o *S. aureus*.

Por fim, nosso estudo revela evidências inéditas sobre a resposta imunológica dos neutrófilos caprinos frente a patógenos relacionados à mastite. Os resultados obtidos não apenas ampliam nosso conhecimento sobre a

dinâmica imune envolvida, mas também abrem caminho para futuras investigações e potenciais avanços no manejo e controle de infecções mastíticas em caprinos.

4.4. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta, pela primeira vez, a resposta dos neutrófilos caprinos por meio da formação de armadilhas extracelulares para aprisionamento de patógenos na presença de *S. aureus* e *S. warneri*, sendo ambos fortes indutores de formação dessas estruturas.

4.5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil) e da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira possui bolsa de produtividade do CNPq.

4.6. REFERÊNCIAS

Andrade, N. C., Laranjo, M., Costa, M. M., & Queiroga, M. C. (2021). Virulence Factors in *Staphylococcus* Associated with Small Ruminant Mastitis: Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 633, 10(6), 633. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060633>

Bardiau, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., & Mainil, J. G. (2016). Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*, 185, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.01.003>

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

Berends, E. T. M., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & Von Köckritz-Blickwede, M. (2010). Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of Innate Immunity*, 2(6), 576–586. <https://doi.org/10.1159/000319909>

Boeltz, S., Amini, P., Anders, H. J., Andrade, F., Bilyy, R., Chatfield, S., Cichon, I., Clancy, D. M., Desai, J., Dumych, T., Dwivedi, N., Gordon, R. A., Hahn, J., Hidalgo, A., Hoffmann, M. H., Kaplan, M. J., Knight, J. S., Kolaczkowska, E., Kubes, P., ... Herrmann, M. (2019). To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation* 2019 26:3, 26(3), 395–408. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0261-x>

Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P. N., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvino, L., & Sordelli, D. O. (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infection and Immunity*, 75(2), 886–891. <https://doi.org/10.1128/IAI.01215-06>

Cacciotto, C., Cubeddu, T., Addis, M. F., Anfossi, A. G., Tedde, V., Tore, G., Carta, T., Rocca, S., Chessa, B., Pittau, M., & Alberti, A. (2016). *Mycoplasma* lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. *Cellular Microbiology*, 18(12), 1751–1762. <https://doi.org/10.1111/CMI.12613>

Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., & Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.011>

Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression (Third)*. Sage. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

França, C. A. (2021). Tolerância e persistência à enrofloxacin em *Staphylococcus* spp. de mastite caprina: caracterização, determinação de fatores de virulência e genômica comparativa. Tese (Doutorado) - Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife.

Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242859>

Goode, K., & Rey, K. (2019). ggResidpanel: Panels and Interactive Versions of Diagnostic Plots using “ggplot2.” <https://CRAN.R-project.org/package=ggResidpanel>

Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I., & Shpigel, N. Y. (2008). β -hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76(6), 2802–2807. <https://doi.org/10.1128/IAI.00051-08/ASSET/1F720E10-9235-48A5-BF3D-697221E98186/ASSETS/GRAPHIC/ZII0060873660004.JPEG>

Grob, D., Conejeros, I., Velásquez, Z. D., Preußner, C., Gärtner, U., Alarcón, P., Burgos, R. A., Hermosilla, C., & Taubert, A. (2020). *Trypanosoma brucei brucei* Induces Polymorphonuclear Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Traps Release. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.559561>

Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2010). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology* 2010 7:2, 7(2), 75–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>

Halverson, T. W. R., Wilton, M., Poon, K. K. H., Petri, B., & Lewenza, S. (2015). DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLOS Pathogens*, 11(1), e1004593. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004593>

Hill, A. W., Heneghan, D. J. S., & Williams, M. R. (1983). The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 8(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(83\)90081-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(83)90081-0)

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346–363.

Kahinda, C. T. M., & Kahinda, C. T. M. (2021). Mastitis in Small Ruminants. *Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.97585>

Kampen, A. H., Tollersrud, T., & Lund, A. (2005). *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 Reduce Killing by Bovine Neutrophils In Vitro. *Infection and Immunity*, 73(3), 1578. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1578-1583.2005>

Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1201719>

Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., von Bernuth, H., & Zychlinsky, A. (2017). Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.24437>

Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Burlak, C., & Deleo, F. R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp*, 53, 505–517. http://www.aite-online/pdf/vol_53/no_6/8424.pdf

Konig, M. F., & Andrade, F. (2016). A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Frontiers in Immunology*, 7(NOV), 224721. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00461/BIBTEX>

Lenth, R. V. (2023). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Goff, J. P., & Horst, R. L. (2006). Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2), 248–255. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2006.05.004>

Muñoz-Caro, T., Machado Ribeiro da Silva, L., Rentería-Solis, Z., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2016). Neutrophil extracellular traps in the intestinal mucosa of *Eimeria*-infected animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4), 301–307. <https://doi.org/10.1016/J.APJTb.2016.01.001>

Nelli, A., Voidarou, C., Venardou, B., Fotou, K., Tsinas, A., Bonos, E., Fthenakis, G. C., Skoufos, I., & Tzora, A. (2022). Antimicrobial and Methicillin Resistance Pattern of Potential Mastitis-Inducing *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolates from the Mammary Secretion of Dairy Goats. *Biology* 2022, Vol. 11, Page 1591, 11(11), 1591. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11111591>

Pérez, M. M., Prenafeta, A., Valle, J., Penadés, J., Rota, C., Solano, C., Marco, J., Grilló, M. J., Lasa, I., Irache, J. M., Maira-Litran, T., Jiménez-Barbero, J., Costa, L., Pier, G. B., de Andrés, D., & Amorena, B. (2009). Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*, 27(17), 2379. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.02.005>

Pisanu, S., Cubeddu, T., Pagnozzi, D., Rocca, S., Cacciotto, C., Alberti, A., Marogna, G., Uzzau, S., & Addis, M. F. (2015). Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis. *Veterinary Research*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13567-015-0196-X/FIGURES/4>

Pohlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K. B., Doring, G., Lee, J. C., Fournier, J. M., Botzenhart, K., & Wolz, C. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to Endothelial Cells: Influence of Capsular Polysaccharide, Global Regulator agr, and Bacterial Growth Phase. *Infection and Immunity*, *68*(9), 4865. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4865-4871.2000>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G., & Middleton, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 149–165. <https://doi.org/10.1111/TBED.12698>

Rainard, P., Gitton, C., Chaumeil, T., Fassier, T., Huau, C., Riou, M., Tosser-Klopp, G., Krupova, Z., Chaize, A., Gilbert, F. B., Rupp, R., & Martin, P. (2018). Host factors determine the evolution of infection with *Staphylococcus aureus* to gangrenous mastitis in goats. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13567-018-0564-4/FIGURES/11>

Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* *2019*, Vol. *9*, Page 365, *9*(8), 365. <https://doi.org/10.3390/BIOM9080365>

Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvão, A., Leitão, A., Vilela, C., & Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, *106*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2014.08.003>

Rosa, N. M., Penati, M., Fusar-Poli, S., Addis, M. F., & Tola, S. (2022). Species identification by MALDI-TOF MS and gap PCR-RFLP of non-aureus *Staphylococcus*, *Mammaliococcus*, and *Streptococcus* spp. associated with

sheep and goat mastitis. *Veterinary Research*, 53(1), 84.
<https://doi.org/10.1186/S13567-022-01102-4/FIGURES/1>

Salaberry, S. R. S., Saidenberg, A. B. S., Zuniga, E., Melville, P. A., Santos, F. G. B., Guimarães, E. C., Gregori, F., & Benites, N. R. (2015). Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microbial Pathogenesis*, 85, 35–39. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2015.05.007>

Seeley, E. J., Matthay, M. A., & Wolters, P. J. (2012). Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(5). <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00069.2012>

Silva, L. M. R., Muñoz Caro, T., Gerstberger, R., Vila-Viçosa, M. J. M., Cortes, H. C. E., Hermosilla, C., & Taubert, A. (2014). The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitology Research*, 113(8), 2797–2807. <https://doi.org/10.1007/S00436-014-3939-0/FIGURES/6>

Swain, D. K., Kushwah, M. S., Kaur, M., Patbandha, T. K., Mohanty, A. K., & Dang, A. K. (2014). Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 209–219. <https://doi.org/10.1007/S11259-014-9606-1/FIGURES/11>

Tran, T. M., MacIntyre, A., Hawes, M., & Allen, C. (2016). Escaping Underground Nets: Extracellular DNases Degrade Plant Extracellular Traps and Contribute to Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathogens*, 12(6), e1005686. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005686>

Tuchscher, L. P. N., Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Caccuri, R. L., Lee, J. C., & Sordelli, D. O. (2005). Capsule-Negative *Staphylococcus aureus* Induces Chronic Experimental Mastitis in Mice. *Infection and Immunity*, 73(12), 7932. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7932-7937.2005>

Wei, Z., Wang, J., Wang, Y., Wang, C., Liu, X., Han, Z., Fu, Y., & Yang, Z. (2019). Effects of neutrophil extracellular traps on bovine mammary epithelial cells in vitro. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01003>

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag, New York.

Worku, M., Rehrach, D., Ismail, H. D., Asiamah, E., & Adjei-Fremah, S. (2021). A Review of the Neutrophil Extracellular Traps (NETs) from Cow, Sheep and Goat Models. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 8046, 22(15), 8046. <https://doi.org/10.3390/IJMS22158046>

Xie, L., Ma, Y., Opsomer, G., Pascottini, O. B., Guan, Y., & Dong, Q. (2021). Neutrophil extracellular traps in cattle health and disease. *Research in Veterinary Science*, 139, 4–10. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.06.019>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção experimental por *S. warneri* teve um impacto significativo na microbiota e composição química do leite das cabras, manifestando notáveis alterações nos constituintes como cloro, cálcio, ferro e cobre. A correlação entre diferentes patógenos e elementos químicos destaca a complexidade dos eventos durante o desenvolvimento da infecção mamária caprina.

Dentro desta complexidade temos diagnósticos imprecisos, que demonstramos em nosso trabalho uma potencial alternativa com a NAGase, já que houve um aumento desta enzima no leite de cabras infectadas e em animais infectadas naturalmente. Além disso, a pesquisa revelou uma resposta, ainda não descrita dos neutrófilos caprinos, formando armadilhas extracelulares para aprisionar patógenos, evidenciando nuances distintas na resposta imunológica para cada micro-organismo. Assim, nosso trabalho também contribui para uma compreensão da interação entre patógenos e o sistema imunológico caprino, oferecendo perspectivas em relação ao manejo dos animais mastíticos.

Reconhecemos as desafios inerentes à implementação de novas metodologias de diagnóstico em ambiente de campo, por exemplo. Contudo, a identificação de métodos alternativos aos tradicionalmente empregados pode representar um avanço significativo no manejo da mastite caprina. Além disso, estudos *in vivo* investigando a resposta imunológica desses animais frente à mastite forneceria informações adicionais sobre os eventos que ocorrem durante a infecção por patógenos.

Compreender cada vez mais as interações multifatoriais, inclusive por meio de técnicas ômicas, é fundamental no contexto da mastite em rebanhos caprinos. Essas abordagens oferecem conhecimentos valiosos sobre os mecanismos envolvidos na doença, possibilitando o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e controle