

## Produção de interleucina-1beta e severidade da mastite pós-inoculação de *Staphylococcus aureus* na glândula mamária de bovinos e bubalinos

### Interleukin - 1 $\beta$ production and severity of mastitis post-inoculation of *Staphylococcus aureus* in the mammary gland of bovines and bubalines

Andrea Maria Lazzari<sup>I\*</sup> Marília Viviane Snel de Oliveira<sup>I</sup> Bruno Moreti<sup>I</sup> Gabriela Guimarães<sup>I</sup>  
Fernanda Krug<sup>I</sup> Giovana Noletto<sup>I</sup> Albenones José de Mesquita<sup>II</sup> Kelly Grace Magalhães<sup>III</sup>  
Anamélia Lorenzetti Bocca<sup>III</sup> Jairo Pereira Neves<sup>IV</sup>

#### RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar, em vacas e em búfalas submetidas à mastite induzida por inoculação de *Staphylococcus aureus*, a concentração da citocina pró-inflamatória interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a contagem de células somáticas (CCS) e a correlação destas com alguns parâmetros da resposta local e sistêmica à inflamação. Os animais tiveram uma glândula mamária inoculada e o processo inflamatório foi monitorado pela cultura bacteriológica do leite, CCS, quantificação da IL-1 $\beta$  na secreção láctea, avaliação da aparência/consistência da glândula, aparência da secreção láctea (resposta localizada à inflamação) e aferição da temperatura retal (resposta sistêmica à inflamação). Houve elevação nos níveis de IL-1 $\beta$ , na CCS e resposta localizada e sistêmica à inflamação, tanto na espécie bovina como na bubalina. A cinética da produção da citocina foi diferente nas duas espécies ( $P < 0,05$ ), sendo que as búfalas apresentaram elevação mais rápida, porém com níveis menos elevados, quando comparadas às vacas. As duas espécies alcançaram contagens máximas semelhantes ( $P > 0,05$ ) de CS/mL de leite, com concentrações diferentes ( $P < 0,05$ ) de IL-1 $\beta$ /mL de leite. Os parâmetros utilizados para verificar a resposta localizada à inflamação demonstraram escores médios mais elevados na espécie bovina. Correlação positiva entre a concentração da IL-1 $\beta$  no leite, CCS e parâmetros utilizados para avaliar a severidade da mastite foi verificada somente na espécie bovina. Os resultados evidenciaram que a cinética de produção da IL-1 $\beta$  foi diferente nas espécies bovina e bubalina e demonstraram que as búfalas desenvolveram um processo inflamatório mais brando, com restabelecimento mais rápido dos parâmetros utilizados para avaliar a severidade da mastite.

**Palavras-chave:** búfalas, citocina, imunidade inata, indução de mastite, vacas.

#### ABSTRACT

This study aimed to analyze in cows and buffaloes, submitted to mastitis induced by inoculation of *S. aureus*, the concentration of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), the somatic cell count (SCC), and their correlation with some parameters of local and systemic response to inflammation. The animals had one mammary gland inoculated and the inflammatory process was monitored by milk culture, SCC, IL-1 $\beta$  measurement in the milk, evaluation of the gland appearance/consistency, milk secretion measurement (systemic response to inflammation). There was increase in the levels of IL-1 $\beta$ , SCC, and both local and systemic inflammatory response, in bovine and bubaline species. The production kinetics of the cytokine was different between the two species ( $P < 0.05$ ). Buffaloes showed a faster increase but achieved lower levels of interleukin-1beta, when compared to cows. Both species reached similar maximum counts ( $P > 0.05$ ) of SC/milk mL, with different concentrations ( $P < 0.05$ ) of IL-1 $\beta$ /mL. The parameters used to verify the local response to inflammation showed higher mean scores in bovine specie. Positive correlation between IL-1 $\beta$  concentration in the milk, SCC and parameters used to analyze the severity of mastitis was verified only in the bovine specie. The results evidenced that the kinetics of IL-1 $\beta$  production was different in the bovine and bubaline species, and demonstrated that the buffaloes developed a milder inflammatory process with faster recovery of the parameters used for mastitis severity evaluation.

**Key words:** buffaloes, cows, cytokine, innate immunity, induced mastitis.

#### INTRODUÇÃO

A mastite é considerada a enfermidade infecto-contagiosa de maior impacto nos rebanhos

<sup>I</sup>Departamento de Medicina Veterinária, União Pioneira de Integração Social (UPIS), 70390-125, Brasília, DF, Brasil. E-mail: lazzari@upis.br.

\*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

<sup>IV</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, DF, Brasil.

leiteiros. Pode ser provocada por inúmeros agentes, porém o gênero *Staphylococcus* é descrito como o agente mais frequentemente isolado (CONTRERAS & RODRIGUES, 2011). *Staphylococcus aureus*, considerada a espécie mais patogênica, é portadora de vários fatores de virulência, dentre eles, os relacionados com a indução/modulação da resposta inflamatória (OTE et al., 2011).

A defesa da glândula mamária a esse e aos demais patógenos é realizada pela imunidade inata e pela imunidade adquirida. A imunidade inata, a mais importante nesse tecido, é representada pelas barreiras físicas, fatores solúveis e fatores celulares (RAINARD et al., 2013).

As citocinas e as células somáticas do leite, fatores solúveis e celulares da imunidade inata, respectivamente, são fundamentais na eliminação do agente infeccioso. As citocinas envolvidas na fisiopatologia da glândula mamária são as interleucinas, interferon- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (SORDILLO et al., 1997; RAINARD et al., 2013). A IL-1 $\beta$ , uma das citocinas pró-inflamatórias mais avaliadas, provoca uma resposta local pela migração transepitelial de neutrófilos, e uma resposta sistêmica, por ser uma potente indutora da febre (WATSON et al., 2011).

As células somáticas do leite são representadas pelos leucócitos e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna da teta (GALIERO & MORENA, 2000). A elevação na contagem de células somáticas (CCS) é representada, principalmente pelo grande aporte de neutrófilos, e constitui parâmetro rotineiramente utilizado para avaliar a sanidade do tecido.

Historicamente, as búfalas são consideradas mais resistentes à mastite em relação às vacas e alguns fatores da imunidade inata têm sido considerados como responsáveis por essa característica (SAHOO et al., 1998). Considerando esta diferença, o objetivo do trabalho foi avaliar, em vacas e búfalas que tiveram uma glândula mamária inoculada com *S. aureus*, a concentração de IL-1b, a CCS e parâmetros da resposta local e sistêmica à inflamação, utilizados na avaliação da severidade da mastite.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte fêmeas primíparas, doze da espécie bubalina (raça Murrah) e oito da espécie bovina (Holandês x Zebu), com um a dois meses de lactação, tiveram uma glândula mamária inoculada com *S. aureus*. O experimento foi realizado em duas etapas,

pré (Dia 1 a D3) e pós-inoculação (D4 a D14), sendo D3, o dia da inoculação. Em D1 e D2, os animais estavam livres de alterações clínicas e infecções nos quartos mamários (anterior esquerdo – AE, AD, PE e PD), confirmado por culturas diárias consecutivas do leite (amostragem diária única/glândula), caneca telada, *California Mastitis Test* (CMT) e contagem eletrônica de CS/mL. Em D3, a confirmação do *status* sanitário das glândulas foi realizado com as análises anteriormente listadas, com exceção da contagem eletrônica de CS.

O isolado bacteriano utilizado foi o SBP 09/10, amostra de campo obtida de vaca com mastite. A preparação do inóculo seguiu a descrição de BANNERMAN et al. (2004) e MARTINS FILHO et al. (2007). A bactéria liofilizada foi inoculada em *Brain Heart Infusion* e incubada a 37°C por 15h. Posteriormente, 1mL deste inóculo foi adicionado a 9mL de água peptonada 0,1% ( $10^{-1}$ ), e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-4}$ . Aliquotas (10 $\mu$ L) de cada diluição foram semeadas, pelo método em superfície, em ágar sangue (AS) ovino 5%, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (MARTINS FILHO et al., 2007). Uma alíquota de 100 $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  foi adicionada a 5mL de salina esterilizada 0,85%, alcançando, nesse volume total, aproximadamente 1000 UFC do *S. aureus*. A glândula AE de todos os animais foi inoculada com 5mL de salina, contendo 1000 UFC e a AD com 5mL de salina esterilizada 0,85% (controle).

A cultura do leite foi realizada com amostras obtidas de forma asséptica, coletadas de todas as glândulas, em todos os dias do experimento. Foi realizada inoculando-se 30 $\mu$ L de leite (LAM et al., 1996) em placas de AS ovino 5%, que foram incubadas a 37°C por 48h. A glândula foi considerada infectada na presença de 100 UFC/mL de leite, na amostragem única diária/glândula ou em caso de isolamento do mesmo patógeno em dois dias consecutivos (ANDERSEN et al., 2010). No período pós-inoculação, as amostras de leite da glândula AE foram utilizadas adicionalmente para contagem do *S. aureus*.

Em dois dias pré-inoculação (D1 e D2) e em seis dias pós-inoculação (D4, D6, D8, D10, D12 e D14), a glândula AE foi ordenhada completamente para a CCS pelo método eletrônico. A contagem foi realizada pelo método de citometria de fluxo, utilizando o equipamento Fossomatic 5000 Basic® (FOSS Electric A/S. HILLEROD, Denmark), calibrado para leite bovino.

A resposta sistêmica foi avaliada pela aferição da temperatura retal. A aferição foi realizada nos dias D5 a D14 e consideraram-se temperaturas de

até 39,1°C como fisiológicas (ATALLA et al., 2009). A resposta localizada foi verificada por alterações na aparência/consistência da glândula, aparência da secreção láctea e CCS. Escores foram utilizados para graduar esta resposta (Tabela 1). O sistema de escores baseou-se em ATALLA et al. (2009), com modificações. Na interpretação da CCS, contagens de até 200.000 CS/mL caracterizaram uma glândula mamária sem resposta inflamatória (SCHUKKEN et al., 2003).

As coletas de leite das glândulas AE e AD, para extração da fração láctea para pesquisa da citocina, foram realizadas em um dia pré-inoculação (D3) e em quatro pós-inoculação (D4, D5, D6 e D7). A fração foi obtida segundo descrição de BANNERMAN et al. (2004) através da centrifugação de 10mL da amostra de leite a 2.952x g (4°C /30min) e remoção da camada de gordura. O leite desnatado foi transferido para tubetes que foram centrifugados por 40min (4°C) a 9.595xg. As frações transparentes foram coletadas e estocadas a -80°C até o momento das dosagens. A pesquisa foi realizada utilizando-se *kit* comercial de ELISA (Bovine IL-1 $\beta$  – Pierce Biotechnology, Rockford, USA), conforme metodologia indicada pelo fabricante. A leitura foi realizada em espectrômetro, utilizando o comprimento de onda de 450nm. A concentração das citocinas foi determinada utilizando a curva padrão, que variou de 2.000pg/mL a 31.250pg/mL.

Foi realizada uma Análise de Variância para determinar a diferença entre as duas espécies. As análises estatísticas das contagens de células

somáticas foram realizadas utilizando o Log da CCS, para efeito de normalização dos dados. Para analisar a cinética da produção de IL-1 $\beta$  no leite, realizou-se um ajuste não linear:  $Y_i = a + b^x + \epsilon$ , em que Y é a variável resposta estudada, x é o dia do experimento em que foi feita a mensuração e  $\epsilon$  é o erro aleatório. O grau de associação entre as variáveis foi verificado pela Correlação de Pearson. Foi utilizado o *Software STATISTICA* versão 8.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de IL-1 $\beta$  no leite da glândula AE no D3 (dia da inoculação) foi 0,002ng/mL ( $\pm 0,001$ ) nas búfalas e 0,006ng/mL ( $\pm 0,002$ ) nas vacas. Nos dias que antecederam a inoculação, as glândulas estavam livres de infecção e a CCS (medianas de D1 e D2) encontrava-se dentro dos parâmetros fisiológicos, 18.000 (4.000-46.000) nas vacas e 26.000 (10.000-82.000) nas búfalas. A inoculação induziu elevação na concentração de IL-1 $\beta$  nas duas espécies. Foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) entre as duas espécies relativa aos níveis de produção de IL-1 $\beta$  /mL de leite da glândula AE. No D4, as búfalas apresentaram uma concentração média de 0,372ng/mL ( $\pm 0,372$ ) e alcançaram o pico no D5, com 0,413ng/mL ( $\pm 0,396$ ) de leite. Ao contrário das búfalas, as vacas apresentaram um aumento médio menos expressivo nas 24h pós-inoculação (0,088ng/mL) ( $\pm 0,042$ ) e alcançaram o pico 72h pós-inoculação (D6) (1,061ng/mL) ( $\pm 1,359$ ) (Figura 1A).

A cultura bacteriana do leite revelou que 100% das vacas e das búfalas, nos três dias posteriores à inoculação, apresentavam *S. aureus* na glândula inoculada. A contagem bacteriana evidenciou que não houve diferença no número de UFC/mL de leite das duas espécies ( $P > 0,05$ ).

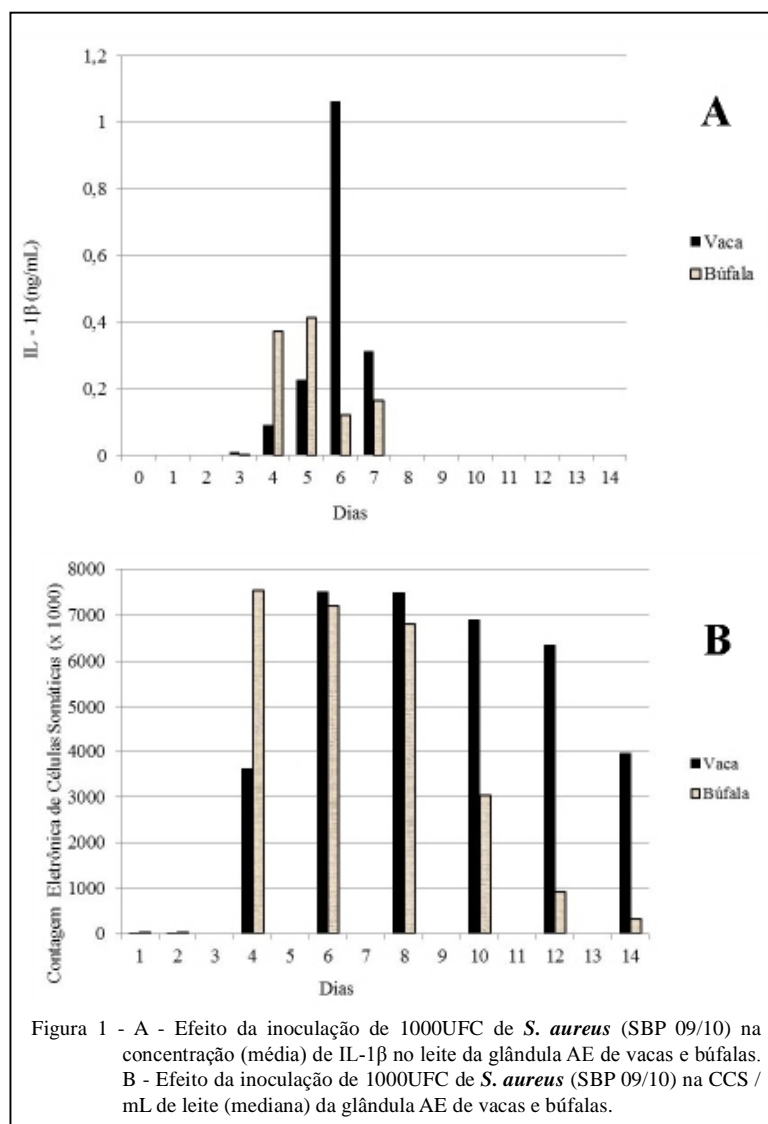
Apesar da glândula AD manter-se livre de infecção, houve elevação na concentração da IL-1 $\beta$ , sendo que o pico nas búfalas foi de 0,031ng/mL no D5 e nas vacas de 0,037ng/mL no D6. Estes dias coincidiram com os picos de produção na glândula inoculada com *S. aureus*. Este achado condiz com MERLE et al. (2007), que descreveram a interdependência entre os quartos mamários ao observarem resposta inflamatória em quartos saudáveis adjacentes a quartos infectados.

Estudos foram realizados no intuito de mensurar a IL-1 $\beta$  no leite bovino, porém, não foram encontradas referências desta análise em leite bubalino. BANNERMAN et al. (2004) inocularam 74UFC de *S. aureus* na glândula mamária de vacas e detectaram aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ . O

Tabela 1 - Critérios utilizados para avaliar a resposta localizada à inflamação em vacas e em búfalas pós-inoculação intramamária de *S. aureus* (SBP 09/10) na glândula AE.

Variável	Critério	Escore
Glândula <sup>1</sup>	normal/fisiológica	0
	edemaciada	1
	lesão ulcerativa <sup>2</sup>	2
Aparência da secreção	normal/fisiológica	0
	cor normal/flocos	1
	cor alterada/seroso	2
CCS <sup>3</sup>	negativo	0
	indeterminado	1
	positivo	2

<sup>1</sup>Aparência e consistência. <sup>2</sup>Secreção serosanguinolenta, evoluindo para purulenta. <sup>3</sup>Negativo, inferior a 200.000CS/mL; indeterminado, entre 200.000-300.000CS/mL e positivo, superior a 300.000.



comportamento verificado foi diferente do encontrado no presente experimento, tanto em relação à concentração máxima de citocina como ao momento do pico e duração dos níveis elevados. A elevação iniciou 16h pós-inoculação, alcançou o pico nas 32h (0,22ng /mL) e nas 48h caiu para concentração pré-inoculação. Corroborando os nossos dados, os pesquisadores também verificaram aumento da citocina nas glândulas controle.

Nessa pesquisa, a concentração máxima de IL-1 $\beta$  no leite da glândula AE bovina foi de 1,061ng /mL, valor superior ao relatado por BANNERMAN et al. (2004). Essa diferença poderia ser explicada pela cepa e carga bacteriana utilizada na inoculação da glândula (1000UFC x 74UFC) e pelos fatores inerentes aos animais utilizados nos experimentos.

Houve elevação significativa ( $P < 0,05$ ) na CCS pós-inoculação, já nas 24h (D4), sendo que, nas búfalas, o aumento foi mais expressivo ( $P < 0,001$ ). A figura 1B mostra a mediana da CCS ao longo do período experimental. Ao analisar a correlação entre a concentração de IL-1 $\beta$  (ng /mL) e a CCS /mL de leite, observa-se diferença entre as duas espécies ( $P < 0,05$ ). Nas vacas, o coeficiente de correlação foi de 0,65 ( $P < 0,05$ ), enquanto que nas búfalas não foi observada correlação ( $P > 0,05$ ). Esta diferença pode ser visualizada observando-se D6. Neste dia, a CCS das duas espécies foi igual ( $P > 0,05$ ), contudo as concentrações de IL-1 $\beta$  foram diferentes ( $P < 0,05$ ), vacas com média de 1,061ng /mL ( $\pm 1,359$ ) e búfalas com média de 0,120ng /mL ( $\pm 0,092$ ) (Figuras 1A e 1B). A correlação detectada na espécie bovina

colabora com a afirmação de ALLUWAIMI (2004) de que a pesquisa e mensuração de citocinas poderiam contribuir no diagnóstico, terapia e controle da mastite.

Pré-inoculação, as búfalas apresentavam 26.000CS /mL e as vacas 18.000CS /mL com concentrações de 0,002ng /mL e 0,006ng /mL de IL-1 $\beta$ , respectivamente. A análise dos resultados sugere que as búfalas, por apresentarem uma contagem inicial de CS mais elevada, foram capazes de reagir mais rapidamente ao patógeno. Segundo MEHRZAD et al. (2005), células de defesa residentes na glândula mamária, sem presença de estímulo inflamatório, são primordiais na defesa deste tecido.

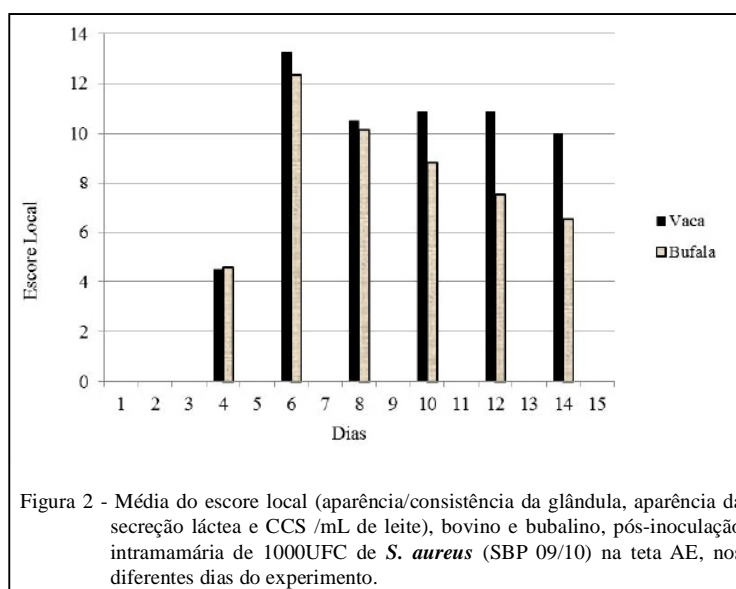
Pós-inoculação, as búfalas responderam mais rapidamente à injúria e aos fatores de virulência do patógeno (demonstrado pela elevação de IL-1 $\beta$  e CS). PAAPE et al. (2003) citam a função das citocinas na regulação dos neutrófilos, células preferencialmente recrutadas e ativas em processos inflamatórios da glândula mamária. A comparação entre as concentrações máximas de IL-1 $\beta$  /mL e de CCS /mL detectadas nas duas espécies animais também indica que as búfalas, com menor concentração de IL-1 $\beta$ , foram capazes de apresentar contagens semelhantes de CS a das vacas (Figuras 1A e 1B). A concentração verificada no pico de IL-1 $\beta$  no leite das vacas foi 1,57 vezes maior que a concentração verificada no pico de IL-1 $\beta$  no leite das búfalas.

A aparência/consistência da glândula inoculada, aspecto da secreção láctea e CCS foram os parâmetros utilizados para calcular o escore da resposta

localizada à inflamação. As médias foram superiores na espécie bovina, com exceção ao resultado obtido no D4 (Figura 2). Foi observada uma correlação positiva ( $P<0,05$ ) entre a concentração de IL-1 $\beta$  no leite das vacas e o escore da resposta localizada,  $r=0,96$  (Figuras 1A e 2). WENZ et al. (2010), semelhante ao presente trabalho, encontraram relação entre a concentração de IL-1 $\beta$  e a severidade da mastite. Essa correlação não foi observada nas búfalas. Este resultado deve-se, principalmente, ao fato de que, no D6, a concentração de IL-1 $\beta$  no leite das búfalas foi baixa, mesmo apresentando um escore elevado (Figuras 1A e 2).

Um dos efeitos sistêmicos desencadeados pela IL-1 $\beta$  é a febre (WATSON et al., 2011). Observando a evolução da concentração da IL-1 $\beta$  (Figura 1A) e analisando a evolução da temperatura retal nos bovinos e bubalinos, percebeu-se que o pico dos dois parâmetros foram distintos nas búfalas e idênticos nas vacas. As vacas apresentaram o pico de IL-1 $\beta$  (média de  $1,061\pm 1,359$ ) e o pico da temperatura retal (média de  $40,78^{\circ}\text{C}\pm 0,62$ ) no D6, e as búfalas, o pico de IL-1 $\beta$  (média de  $0,413\pm 0,396$ ) no D5 e o pico da temperatura retal (média de  $40,70^{\circ}\text{C}\pm 0,75$ ) no D6. A análise estatística revelou correlação ( $P<0,05$ ) de 0,81 nas vacas e ausência de correlação nas búfalas. BANNERMAN et al. (2004), em vacas, relataram que a elevação da IL-1 $\beta$  no leite teve correlação com o início da resposta febril. Semelhante ao presente experimento, o momento de pico dos dois parâmetros ocorreu no mesmo período.

A resposta inflamatória de bubalinos, observada pela elevação da CCS e da IL-1 $\beta$  (Figuras 1A e 1B), ocorreu mais intensamente nas 24h pós-



inoculação, quando comparado aos bovinos, porém alcançou concentrações menos elevadas nos demais dias de avaliação. Sugere-se que este fator possa ser o responsável pela menor severidade da mastite nesta espécie e recuperação mais rápida das variáveis utilizadas para calcular o escore da resposta localizada à inflamação.

## CONCLUSÃO

Vacas e búfalas submetidas à inoculação intramamária de aproximadamente 1000 UFC de *S. aureus* apresentam elevação na CCS, elevação na concentração de IL-1 $\beta$  no leite e resposta localizada e sistêmica à inflamação. As búfalas demonstram uma elevação mais rápida de IL-1 $\beta$ , porém as vacas alcançam uma concentração mais elevada. Na espécie bovina, há correlação entre a concentração da IL-1 $\beta$ , CCS e severidade da mastite. A espécie bubalina alcança contagem máxima de células somáticas à semelhança da espécie bovina, mas com menor concentração de IL-1 $\beta$ . Baseado nestes dados, pode-se concluir que, no modelo proposto, as búfalas desenvolvem um processo inflamatório mais rápido e menos severo que as vacas, o que antecipa o restabelecimento dos parâmetros utilizados para avaliar a resposta à inflamação.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O comitê de ética das Faculdades Integradas da União Pioneira de Integração Social (UPIS) aprovou o protocolo deste estudo experimental (Protocolo nº 005/10).

## REFERÊNCIAS

- ALLUWAIMI, A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.211-222, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528804000852#>>. Acesso em: 19 abr. 2014. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.04.006.
- ANDERSEN, S. et al. Diagnosing intramammary infections: Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.7, p.2966-2975, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630213>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.3168/jds.2009-2726.
- ATALLA, H. et al. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.326-334, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509000480>>. Acesso em: 19 abr. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.027.
- BANNERMAN, D.D. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.3, p.463-472, 2004. Disponível em: <<http://cdli.asm.org/content/11/3/463.full>>. Acesso em: 19 abr. 2014. doi:10.1128/CDLI.11.3.463-472.2004.
- CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUES, J.M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, p.339-356, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10911-011-9234-0>>. Acesso em: 19 abr. 2014. doi: 10.1007/s10911-011-9234-0.
- GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, n.1, p.26-27, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000042&pid=S0102-0935200700010003900004&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000042&pid=S0102-0935200700010003900004&lng=en)>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 20013014633.
- LAM, T.J.G.M. et al. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.208, p.1705-1708, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641956>>. Acesso em: 19 abr. 2014.
- MARTINS FILHO, L.P. et al. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **ARS Veterinária**, v.23, n.2, p.75-80, 2007. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/133/114>>. Acesso em 20 de abr. 2014.
- MEHRZAD, J. et al. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. **Veterinary Research**, v.36, p.101-116, 2005. Disponível em: <<http://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2005/01/V4042.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1051/vetres:2004055.
- MERLE, R. et al. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.174-179, 2007. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=1022180>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1017/S002202990600238X.
- OTE, I. et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.285-292, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511003208>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.042.
- PAAPE, M.J. et al. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v.34, p.597-627, 2003. Disponível em: <<http://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2003/05/V3505/V3505.html>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1051/vetres:2003024.
- RAINARD, P. et al. THelper 17-associated cytokines are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. **Plos one**, v.8, n.5, p.1-16, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0063471>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0063471.

SAHOO, G. et al. A comparative study on certain enzymes of the granulocyte from different ruminant species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.319-325, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957197000295>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1016/S0147-9571(97)00029-5.

SCHUKKEN, Y.H. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v.34, p.579-596, 2003. Disponível em: <<http://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2003/05/V3509/V3509.html>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1051/vetres:2003028.

SORDILLO, L.M. et al. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030297761216>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: org/10.3168/jds.S0022-0302.

WATSON, C.J. et al. Cytokine signaling in mammary gland development. **Journal of Reproductive Immunology**, v.88, p.124-129, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037810004109>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.1016/j.jri.2010.11.006.

WENZ, J.R. et al. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.6, p.2458-2470, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210002493>>. Acesso em: 20 abr. 2014. doi: 10.3168/jds.2009-2819.