

ANDRÉA ALICE DA FONSECA OLIVEIRA

Avaliação da citologia aspirativa e de expressão no diagnóstico da mastite bubalina e pesquisa de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* toxigênicas e produtoras de beta-lactamase.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária..

Botucatu-SP

2003

ANDRÉA ALICE DA FONSECA OLIVEIRA

Avaliação da citologia aspirativa e de expressão no diagnóstico da mastite bubalina e pesquisa de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* toxigênicas e produtoras de beta-lactamase.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes

Botucatu

2003

**A minha mãe,
por todo amor, compreensão e força para superar a distância
que nos separava.**

**Ao meu grande companheiro e namorado Marcos pelo carinho e
paciência.**

**Às amigas Mércia e Louisiane,
por tudo que rimos e choramos juntas e pelo ombro amigo nas
horas mais difíceis da minha vida.**

DEDICO

**À orientadora Prof^a Dra. Noeme Sousa Rocha pela confiança
depositada em mim e por me receber de braços abertos sem
nenhuma restrição**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À energia superior que me governa, ilumina e determina em minha vida rumos nunca imaginados e que no entanto são sempre os certos: Deus;

À minha mãe Tereza Cristina por ser simplesmente o que é: força, determinação, coragem e amor;

Aos meus queridos irmãos Daniela e Rodrigo por serem tão batalhadores e acreditarem em mim;

Ao meu namorado Marcos pela força, amor e paciência a mim dispensados;

A minha orientadora Prof^a Dra. Noeme Sousa Rocha, agradecimentos são poucos para demonstrar a sua importância em minha vida;

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Alberto pela oportunidade que me ofereceu e grande colaboração na realização deste trabalho;

Ao Prof. Rinaldo Mota (UFRPE) meu grande exemplo de ser humano, pela contribuição na minha formação profissional, moral e pela oportunidade de me apresentar à UNESP-FMVZ;

À Prof^a Maria de Lourdes (Lurdinha) pela forma tão humilde de oferecer o seu laboratório e material para realização do experimento;

Ao Prof. Hélio Langoni que sempre me recebeu de braços abertos em seu laboratório, pela colaboração no processamento das amostras;

Ao Prof. Josias Rodrigues pela grande colaboração neste trabalho cedendo seu laboratório, material e confiança;

Ao Prof. André Mendes Jorge e ao Prof. Alcides de Amorim Ramos pela imensa colaboração na indicação das propriedades utilizadas neste estudo e pelo laço de amizade que formamos;

À Profª Eunice Oba pela indicação de profissionais e proprietários;

Ao Prof. Eduardo Bagagli e pós-graduanda Sandra Bosco (Instituto de Biociências) pela amizade e colaboração na identificação das amostras fúngicas;

À Profª Tereza Cristina Sequeira pela amizade, alegria e colaboração com a alíquota de *taq* e ao Prof. Júlio Sequeira por me receber na patologia e pela convivência diária;

Ào Cassiano Victoria pela grande colaboração na execução deste trabalho e pela paciência no processamento das amostras;

À Liliane de Oliveira Dantas (Lili) por toda execução da PCR cedendo seu material e paciência e a grande amiga de longa data;

Ao Pesquisador Dr. Raymundo Rizaldo (EMBRAPA) pela grande ajuda na estatística e amizade;

Às amigas Louisiane e Mércia, vocês moram no meu coração, sem comentários;

Aos amigos conquistados na patologia: Celmira, Fábio e Camila, pelos ótimos momentos em que passamos juntos, vocês poderão sempre contar comigo e também moram no meu coração;

Aos amigos da pós-graduação: Adriana (despreparada), Anne e Gaspar, Caio, Ana (Radiologia), Tipa, Luiz, Sara, Diones, Edna (galega), Adriano (ornito) e Sandra pelos ótimos momentos em que vivemos juntos;

À amiga Cristianne (Cris) pela grande amizade que construímos e bons tempos de vizinhança;

Aos amigos: Daniel Araújo (UECE), Osimar, Daniel Pessoa, Ranielly, Fábio, Acácia e Edy (Zoonoses), Júlia e Vanessa (Zoonoses) e Fernando (MI) pela amizade.

Aos amigos de sempre Leomar, Chico, Mauro (gaúcho), Wildo e Otávio (tatá) por tornarem melhor minha estadia em Botucatu;

Aos amigos da Rural de Pernambuco: Sineide, Léo, Prof. Lêucio e a todos que torceram pelo meu sucesso;

Ao amigo Maury Raul (codorninha) pela convivência diária na patologia e pela amizade e respeito que construímos diariamente;

Aos funcionários Pedro Oyan, Tino e Dito pela grande colaboração neste trabalho, paciência e ensinamentos;

Aos Funcionários da FMVZ Denise, Carlão e Marcelo pela paciência nas perturbações diárias que deixarão saudades;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP por possibilitar a execução deste trabalho, pela bolsa e reserva técnica concedida;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP campus de Botucatu, por possibilitar a realização do doutorado e execução do experimento;

Por fim, a todos os que acreditaram no meu trabalho e capacidade, me dando forças para crescer cada vez mais, eis o resultado.

Muito Obrigada!

“ Volta teu rosto sempre na
direção do sol e então as sombras
ficarão para trás.” (Sabedoria
oriental).

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. LITERATURA: REVISÃO	19
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Propriedades	34
4.2 Amostragem/Animais	34
4.3 Colheita de Amostras	34
4.4 Contagem de Células Somáticas	35
4.5 Citologia Aspirativa por Agulhas Finas da Glândula Mamária	35
4.6 Citologia de Expressão	36
4.7 Procedimentos Microbiológicos	36
4.7.1 Contagem do Total de Bactérias Aeróbicas Mesófilas	36
4.7.2 Isolamento e Identificação de Bactérias e Fungos	37
4.8 Caracterização de Linhagens Toxigênicas de <i>S. aureus</i>	37
4.9 Caracterização das Linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas	38
4.9.1 Isolamento e Caracterização Bioquímica	39
4.9.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	39
4.10 Sorologia para <i>E. coli</i>	41
4.11 Avaliação da Sensibilidade Bacteriana a Agentes Antimicrobianos	45
4.12 Análise da Produção de β -Lactamase	45
4.13 Análise Estatística dos Dados	46
5. RESULTADOS	48
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ANEXOS	88

Lista de Quadros

Quadro 1 – Representação dos componentes da PCR para análise da *E. coli*
isoladas de leite bubalino41

Quadro 2 – Características da PCR utilizada na detecção dos genes de *E. coli*
isoladas de leite bubalino43

Lista de Figuras

Figura 1-Fotomicrografia eletrônica do BFP em <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (Salton & Kim, 2001)	29
Figura 2 - Kit RPLA (Oxoid) utilizado para pesquisa de cepas toxigênicas de <i>S. aureus</i>	39
Figura 3 – Reação sorológica para identificação de antígenos somáticos (O) de <i>E. coli</i> . A: resultado positivo; B: resultado negativo	42
Figura 4 – Citologia de expressão de mama bubalina, evidenciando (setas) a celularidade. Giemsa, 400x.	119
Figura 5 - “Cluster” de células epiteliais com evidência dos nucléolos obtidas por CAAF de mama bubalina. Shorr, 400x.	119
Figura 6 - <i>Aspergillus fumigatus</i> isolado de leite bubalino. Azul de algodão, 400x	120
Figura 7 – Discos de cefinase para realização do teste de produção β -lactamase, amostras positivas apresentam coloração avermelhada (setas)	121
Figura 8 – Preparação dos componentes e amostras de <i>Escherichia coli</i> para realização da PCR	122
Figura 9 – Eletroforese das amostras de <i>Escherichia coli</i>	122
Figura 10 - Reação de aglutinação positiva (seta), para detecção de TSST-1. Técnica de RPLA.	123
Figura 11 – Microplaca com reações negativas para enterotoxinas. Técnica de RPLA.	123

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resultado do exame de CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002	52
Tabela 2 - Distribuição das contagens do total de bactérias aeróbicas mesófilas (amostras com intervalo de 25-250 UFC/mL) procedentes de amostras de leite de búfalas de acordo com as diluições utilizadas	79
Tabela 3 - Contagem de células somáticas (CCS) de 548 amostras de leite, distribuídas entre diferentes classes de escores do “Califórnia Mastitis Test” (CMT).....	80
Tabela 4 - Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Esp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), concordância (Conc), índice Kappa e Qui quadrado (χ^2) para CMT, CCS, WSM e exame microbiológico (Micro) em relação a CAAF de 400 amostras de leite e punção em mama de búfalas	81
Tabela 5 – Amostras negativas obtidas na citologia de Expressão frente a testes padrões para o diagnóstico da mastite bubalina	82
Tabela 6 - Resultado da pesquisa de toxinas pelo método RPLA em graus de aglutinação em amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de leite bubalino.....	83
Tabela 7 – Resultado da Reação em Cadeia de Polimerase e eletroforese para marcadores genéticos de virulência em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de leite bubalino	83

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Percentual de quartos mamários de búfalas reagentes e negativos ao exame de CMT.....	50
Gráfico 2 – Percentual de quartos mamários de búfalas positivos e negativos ao exame microbiológico do leite	50

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Estudou-se a viabilidade da utilização da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e Citologia de Expressão (CE) em 137 búfalas, procedentes de sete propriedades leiteiras, localizadas nos municípios de Jaú, Botucatu e Sorocaba, estado de São Paulo, como novo recurso no diagnóstico precoce da mastite, além da frequência de mastite subclínica, as características dos agentes etiológicos envolvidos, a relação entre a Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo método automático, reação ao “California Mastitis Test” (CMT), reação ao “Whiteside” modificado WSM contagem de bactérias aeróbias mesófilas e exame microbiológico, avaliou-se, ainda, a sensibilidade bacteriana frente a antimicrobianos, produção de beta-lactamase para *E. coli* e *S. aureus*, além da caracterização pela Reação em Cadeia de Polimerase das amostras de *Escherichia coli* isoladas e pesquisa da produção de toxinas estafilocócicas. Dos 548 quartos mamários estudados, obteve-se uma frequência para mastite subclínica de 16,8%. O *Staphylococcus epidermidis* o agente mais frequente (21,43%). A média da CCS obtida nas amostras analisadas foi de 170, 26 x 10³ cél./mL de leite. As cepas de *S. aureus* apresentaram maior sensibilidade para Metilina (100%), Amoxilina + Ácido clavulônico (100%), Cefalotina (84%) e Gentamicina (67%) e as *E. coli* para Enrofloxacin (100%), Gentamicina (100%) e Cefoperazone (100%). Das seis (06) cepas de *S. aureus* isoladas cinco (05) foram produtoras de TSST-1 e uma (01) para EEA. A produção de beta-lactamase foi de 83% para as cepas de *S. aureus* e 57% para *E. coli*. A CAAF apresentou ótima especificidade (96%) da mesma forma que a CE por análise comparativa, quando comparada com outras técnicas para diagnóstico da mastite, verificando-se a predominância de neutrófilos nas amostras com reação inflamatória, deste modo conclui-se que a CAAF e a CE podem ser utilizadas para determinação do grau de inflamação da glândula mamária de búfalas.

ABSTRACT

The viability of Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) and Expression Cytology (EC) in 137 buffalos, proceeding of seven farms in Jaú, Botucatu and Sorocaba municipal districts in São Paulo State were studied. Frequency of subclinical mastitis, feature of etiological agents, production of toxins in *Staphylococcus aureus* and beta-lactamase by *S. aureus* and *Escherichia coli* were studied too. Total of 548 udder quarters, the frequency was 16,8%. *Staphylococcus epidermidis* was the pathogen found in 21,43% of samples and was the highest rate. The Somatic Cell Count (SCC) media was $170,26 \times 10^3$ cell/mL of milk. Sensibility to antimicrobial drugs demonstrate *S. aureus* was more susceptible methicilin, Amoxilin + Clavunonic acid, cephalothin and gentamicin and *E. coli* to enrofloxacin, gentamicin and cefoperazone. Five (05) samples *S. aureus* tested were producers TSST-1 and one (01) enterotoxin A (EEA). The beta-lactamase production was 83% in *S. aureus* samples and 57% to *E. coli* samples. A excellent specificity (96%) was observed to FNAC and EC when compared to others techniques to mastitis diagnostic. Neutrophils were the most prevalent cellular type in the analyzed samples. The FNAC and EC can be used for determination of inflammation grade in the buffaloes mammary gland.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A principal função do búfalo, nos países ou regiões onde é explorado, consiste na produção de leite, não apenas devido a sua superioridade revelada na produção quantitativa, como principalmente, pelo elevado teor de matéria gorda que caracteriza o leite bubalino; isto provavelmente pela característica própria da espécie que tem a capacidade de transformar alimentos grosseiros, inferiores e do mais insignificante valor nutritivo em leite saboroso, rico em gordura destinado tanto ao consumo *in natura*, como preparo de queijos, manteiga e outros derivados (Fonseca, 1987).

Há hoje, no Brasil, quatro raças de búfalos reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Carabao, Jafarabadi, Mediterrâneo e Murrah. A Carabao apresenta aptidão para produção de carne e tração e as demais para carne e leite (Nascimento & Carvalho, 1993).

A inflamação da mama representa sério problema para a indústria leiteira, influenciando de forma decisiva no lucro das propriedades leiteiras. As perdas econômicas devido à mastite bubalina são grandes e usualmente ocorrem na forma de redução na produção, custos devido ao leite descartado, gastos com tratamentos e honorários veterinários (Hamza & Choudhuri, 1994a; Singh & Singh, 1994).

Singh & Singh (1994), em estudo realizado na Índia, observaram perdas na produção de leite de búfalas com mastite clínica e subclínica em torno de 17,5% e prevalência de 24,4% para mastite subclínica nesta espécie. Estimaram, também, a perda na produção de leite por mastite subclínica em torno de 0,35 l/animal/dia.

O “California Mastitis Test” (CMT) tem por base a estimativa do conteúdo de células somáticas no leite sendo interpretado subjetivamente pelo

estabelecimento de escores que na maioria dos casos variam de um a cinco. Dependendo da interpretação dos escores, o CMT pode revelar resultados falso-positivos ou falso-negativos. O principal fator que influencia o aumento das células somáticas no leite é o estado infeccioso, entretanto, outros fatores como idade do animal, estágio da lactação e estresse podem influenciar esse aumento (Brito *et al.*, 1997).

O “Whiteside” modificado (WM) é um dos testes indiretos utilizados no diagnóstico de mastite, desenvolvido por Murphy e Hanson em 1941. Apresenta boa correlação com a contagem leucocitária do leite. Assim como outras provas indiretas, o WM pode detectar os menores graus de irritação da glândula (Vihan & Sahni, 1987).

Contudo, o diagnóstico da mastite bubalina ainda não está totalmente esclarecido, apesar da utilização de técnicas já padronizadas recomendadas para bovinos, como por exemplo, o CMT e o Whiteside. Neste contexto, a citologia diagnóstica (CD) técnica em uso já há algum tempo na medicina humana, surge como forma de diagnóstico na Medicina Veterinária. Sua primeira utilização foi no Memorial Hospital for Cancer and Allied Diseases, em Nova Iorque, no ano de 1930. Na Medicina Veterinária a utilização deste método vem crescendo desde 1980, conforme Ménard *et al.* (1986).

A citologia oferece a possibilidade de alcance em mais de dez planos da lesão em relação à biópsia com apenas um plano e possibilita também a obtenção de uma amplitude de área examinada quase dez vezes maior que a biópsia (DeMay, 1996).

A cultura da secreção do úbere, entretanto, é considerada o método mais seguro para identificar a causa da infecção mamária. As bactérias patogênicas isoladas com maior frequência são o *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (Saini *et al.*, 1994; Oliveira, 1997; Naiknaware *et al.*, 1998).

A presença de fungos causadores de mastite como único agente ou associado a bactérias tem tido grande importância atualmente, não apenas como causa de grandes prejuízos econômicos, mas também por tornar o leite impróprio para o consumo humano. Em 150 amostras obtidas de animais com mastite clínica e subclínica, 74 (49,33%) foram positivas ao CMT, com 6,8% do total das amostras positiva para fungos; destas 5,4% foram *Candida albicans* e 2,27% *Aspergillus* spp. (Mahapatra *et al.*, 1996).

A sensibilidade dos testes indiretos na detecção da mastite subclínica em búfalos foi pesquisada por Tijare *et al.* (1999). Quando comparado ao exame microbiológico do leite, de todos os testes analisados, o de condutividade elétrica demonstrou ter maior correlação de positividade que os demais testes, sendo considerado como o mais eficaz. Os autores consideraram que durante a aplicação dos vários testes indiretos houve muita variação em relação à sensibilidade destes e consideraram como uma explicação plausível o fato da associação de bactérias a outros microrganismos podendo influenciar e alterar os resultados.

Dentre as provas utilizadas para avaliação da qualidade do leite, principalmente em bovinos, o conteúdo leucocitário representado pela Contagem de Células Somáticas (CCS), é um bom indicador do estado de higidez da mama (Meirelles *et al.*, 1997).

Prasad *et al.* (1996) obtiveram em búfalas com mastite subclínica cerca de 87 a 95% das amostras com CCS máxima de 250.000 cél/mL; as razões deste número foram atribuídas à alta resistência dos animais nativos às

condições ambientais ou devido à diferença existente em certas estruturas nas tetas das búfalas e salientaram ainda a necessidade da realização de novos estudos sobre o assunto.

O *Staphylococcus* spp. e principalmente o *Staphylococcus aureus* destacam-se como agentes causais mais comuns em casos de toxinfecção alimentar, decorrente da ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria, sendo esta termoestável, resistente ao cozimento e à pasteurização (Penna *et al.*, 1988).

Vários testes, como a imunodifusão, Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA), radioimunoensaio e ELISA são utilizados para detecção de enterotoxinas estafilocócicas (Bergdoll, 1990).

O RPLA apresenta grandes vantagens devido à sua alta especificidade e sensibilidade, detectando níveis mínimos de até 0,75 ng/g de alimento, além de ser um método simples rápido e de baixos custos (Park e Szabo, 1986).

O aparecimento de linhagens resistentes a antibióticos ocorre pela seleção de mutantes na população bacteriana exposta ao antibiótico. A atividade hidrolítica das β -lactamases que inativam antibióticos β -lactâmicos são os principais mecanismos de aquisição de resistência por bactérias patogênicas gram-negativas (Vakulenko *et al.*, 1998).

O *Staphylococcus aureus* caracteriza-se por uma variedade de fatores patogênicos que podem levar a danos nos tecidos da glândula, ao escape dos mecanismos de defesa e a neutralização natural ou adquirida de antibióticos. A presença do plasmídeo 2027-bp foi associada com a redução da resposta neutrofílica e aumentou a resistência frente a antimicrobianos β -lactâmicos, portanto, cepas que carregam este plasmídeo apresentam alta probabilidade de

invadir e colonizar a glândula mamária, sobreviver a terapia antimicrobiana e tornar-se indetectável (Piccinini & Zecconi, 2001).

LITERATURA: REVISÃO

2. LITERATURA: REVISÃO

Da importância da bubalinocultura, Cockrill (1994) afirma que, de todas as espécies domésticas que servem a humanidade o búfalo asiático detém a maior perspectiva e potencial para a produção.

O leite de búfala é muito popular e valorizado em lugares onde a dieta é deficiente em proteína, contendo 30% a mais de proteína que o leite bovino, além de apresentar níveis de colesterol mais baixos (Zava, 1987).

Vale (1994) cita que é fato bem conhecido que, o búfalo é a espécie mais eficiente na conversão de fibras em leite do que o bovino, necessitando de 10.000 Kcal para produzir um quilo de leite contra as 15.000 Kcal do bovino. O mesmo autor afirma ter ocorrido no estado de São Paulo um “boom” na produção de leite utilizada na industrialização de queijos, especialmente do tipo “ricota” e “mozzarella”.

Nascimento & Carvalho (1993) comparam a composição química do leite bubalino e bovino segundo os seguintes aspectos:

Espécie	Água	Matéria Seca	Gordura	Proteína	Minerais	Cálcio	Fósforo
Bubalina	81,7	18,3	8,0	4,5	0,8	0,18	0,13
Bovina	88,1	12,0	3,0	3,2	0,7	0,12	0,15

Nas espécies bovina e bubalina, os fatores relacionados à injúria da teta, defeitos no esfíncter, permanência do patógeno e estado imune dos diferentes quartos, representam um importante papel no desenvolvimento da mastite subclínica. A susceptibilidade subclínica em búfalas é muito reduzida quando comparada a vaca, possivelmente pela espessura da camada do epitélio e

queratina, além de uma melhor organização da musculatura do esfíncter do teto (Saini *et al.*, 1994).

Thirunavukkarasu e Prabakaran (1998) encontraram correlação significativa entre mastite bubalina, o estágio de lactação, número de lactações, anormalidades do úbere, estação do ano, higienização dos estábulos e tipo de ordenha.

Láu *et al.* (1986) afirmaram que a maioria das búfalas positivas ao diagnóstico de mastite subclínica através do CMT, Whiteside Modificado e Púrpura de Bromocresol, encontrava-se entre a quarta e sexta lactação, acreditando-se ser este o período em que as búfalas tornam-se mais susceptíveis às infecções do úbere. Notaram também que o maior número de búfalas suspeitas encontravam-se entre a primeira e segunda lactação e que grande maioria das infecções ocorre em um quarto do úbere e não em dois ou mais, não havendo predileção pela localização dos mesmos.

Em estudo realizado em Punjab na Índia, Saini *et al.* (1994) notaram incidência de 2,59% para mastite subclínica em búfalas, sendo baixa durante a primeira lactação e aumentando nas subseqüentes.

Vianni *et al.* (1990) referem-se ao CMT como método diagnóstico que apresenta boa sensibilidade na estimativa de células somáticas no leite bubalino, pois obtiveram uma concordância de 93,7% entre o CMT e as contagens de células somáticas em 159 quartos mamários de búfalas reagentes ou não ao CMT.

Estudo realizado no Vale do Ribeira por Costa *et al.* (1997b) revelou uma positividade de 14,5% do total de 1.252 quartos ao CMT e do total de 863 exames microbiológicos 23,7% foram positivos, havendo alta ocorrência de *Corynebacterium* spp. (59,25%) e *Staphylococcus* spp. (17,59%).

Em bubalinos, são escassos os estudos que empregaram o "Whiteside" modificado (WM) no auxílio ao diagnóstico da mastite subclínica e clínica, contudo estes poucos estudos revelam que o CMT, WM e o teor de cloretos conferem credibilidade ao diagnóstico, apesar de não demonstrarem exatidão entre si, neste contexto, Oliveira (1997) descreveu sensibilidade para o WM de 45,3%, um pouco mais elevada do que a observada para o CMT (26,6%) entretanto esta ainda foi considerada baixa.

A principal característica do exame citológico é a rapidez do diagnóstico, além da simplicidade de execução, necessidade de pequena quantidade de material, estressa pouco o animal, é inócua, de baixo custo e boa resolução no diagnóstico microscópico das lesões, permitindo a distinção entre processos inflamatórios agudos ou crônicos (com base nos tipos de leucócitos predominantes), e neoplásicos, benignos ou malignos (Guedes *et al.*, 1997; Rocha, 1998).

A citologia aspirativa por agulhas finas (CAAF) envolve o exame microscópico obtido de massas sólidas ou fluídas, que são posteriormente classificadas em duas grandes categorias de valores clínicos: processos inflamatórios ou neoplásicos, permitindo também o estudo da evolução do processo (Rocha, 1998).

O diagnóstico citológico de infecções bacterianas permite ao médico veterinário a sugestão do agente etiológico envolvido e indicação de terapia antimicrobiana inicial provisória, antes de obter-se os resultados da cultura bacteriana e antibiograma, entretanto exige experiência e habilidade técnica, no reconhecimento das espécies (Clinkenbeard *et al.*, 1995).

Kumarasinghe (1997) refere-se à biópsia aspirativa por agulha fina como procedimento diagnóstico padronizado para várias enfermidades mamárias no

homem, utilizada com sucesso no diagnóstico de mastite granulomatosa; principalmente na diferenciação das específicas como a tuberculosa e a micótica de outras mastites bacterianas.

A detecção de bactérias pela CAAF no local da resposta inflamatória na glândula mamária deve ser interpretada com cautela, a observação de bactérias sem aumento significativo de neutrófilos, pode sugerir que a amostra tenha sido contaminada por bactérias comensais (Clinkenbeard *et al.*, 1995).

Martinez-Girón & Ribas-Barceló (2001) ressaltam a presença relativamente freqüente de algas nas lâminas citológicas e que apesar da possibilidade de contaminação pela água utilizada nas lavagens das lâminas, a presença de microalgas pode ser interpretada de forma errônea como fibras de origem vegetal ou sintética e pólen determinando um falso diagnóstico.

A sua utilização em estudos relacionados à mastite bovina foi realizada primeiramente por Domingues (1999), que obteve predominância de reações agudas e de intensidade discreta para os animais com mastite, demonstrando também que a técnica não influenciou na produção leiteira dos animais, sendo sua utilização inédita em estudos na mastite bubalina.

A citologia de expressão já é utilizada com freqüência na Medicina Humana, entretanto em Medicina Veterinária e principalmente em animais de produção torna-se inédita a sua utilização. Se a mama apresenta um fluxo abundante e espontâneo, ao se efetuar uma ligeira pressão sobre ela, gotas de líquido poderão ser obtidas com auxílio de lâminas e imediatamente fixadas (Azíra, 1976).

Segundo Godden *et al.* (2002) a sensibilidade da cultura bacteriológica para detecção de mastites infecciosas aumenta com o número de UFC/mL na amostra de leite. Portanto, nenhum método de coleta de amostras ou

manipulação que leve ao aumento no número de UFC/mL no leite deverá resultar na melhora da detecção de *Staphylococcus aureus* nos quartos com infecção intramamária subclínica. Neste estudo, foi relatado que coletas pós-ordenha com congelamento das amostras demonstraram aumento na sensibilidade de detecção do *Staphylococcus aureus* quando comparado com uso de amostras frescas pós-ordenha, entretanto, não houve correlação positiva entre amostras congeladas coletadas antes da ordenha com amostras frescas do mesmo momento.

Na espécie bovina há uma alta associação entre a presença de bactérias e mastite, o que de certa forma não ocorre em búfalas. Bactérias não patogênicas podem permanecer no úbere e no animal de forma geral, pelo convívio em áreas alagadas (Hassan *et al.*, 1984).

Costa *et al.* (1997a) encontraram positividade ao exame bacteriológico para um total de 468 amostras de 42,25% no início de lactação, 33,34% no meio da lactação e 20,31% no final da lactação, sendo o *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. os agentes mais freqüentemente isolados nessas três fases.

O gênero *Corynebacterium* atualmente destaca-se em pesquisas da mama sendo implicados em importantes infecções no homem e nos outros animais. Algumas espécies, destacando-se o *Corynebacterium aquaticum* atualmente designado de *Aureobacterium* podem ser isoladas no leite e derivados, solo, água doce e plantas, sendo incriminados nos humanos como causadores raros de endocardites, meningites e peritonites (Janda, 1998).

Ao exame de 154 amostras de leite de búfalas da raça Murrah com mastite subclínica, Langoni *et al.* (1994) obtiveram isolamento de *Corynebacterium bovis* (31,7%), *Staphylococcus epidermidis* (30,5%),

Streptococcus agalactiae (26,9%), *Staphylococcus aureus* (4,9%), *Actinobacter calcoaceticus* (2,4%), *Pasteurella multocida* (2,4%) e *Bacillus* spp. (1,2%).

Varshney *et al.* (1993) caracterizando bioquimicamente 49 amostras de *S. aureus* de origem mamária bubalina pela produção de coagulase, fator clumping, atividade hemolítica, produção de pigmento e fermentação da maltose e manitol, revelaram que as características bioquímicas do *S. aureus* procedente de bubalinos não diferem dos de origem bovina.

As diferenças entre práticas de manejo, resposta imune e estrutura da mama, o nível de controle de mastite bem como a frequência relativa de ocorrência de contágio e patógenos oportunistas da microbiota da pele, devem ser levados em consideração na diferenciação entre vacas e búfalas com respeito à mastite por *Escherichia coli*, menos severa e menos frequentes em búfalas e não necessariamente associadas ao parto nesta espécie. Búfalas de hábito aquático apresentam elevada taxa de mastites de origem ambiental com índices de isolamento de *E. coli* em torno de 10,34% (Muhammad *et al.*, 1995).

Ao longo dos anos a mastite micótica bubalina e bovina tem adquirido maior importância, isto pode ser atribuído a vários fatores como tratamento de mastite sem diagnóstico apropriado, administração prolongada de antibióticos e esteróides e contaminação por infusões intramamárias. Relatos como o de Chhabra *et al.* (1996) revelaram alta prevalência para mastite micótica sendo os fungos e leveduras isoladas de 10% e 16,6% das amostras respectivamente. O isolamento de fungos em animais aparentemente saudáveis foi responsável pelo elevado índice de mastite subclínica.

Chhabra *et al.* (1998) detectaram mastite micótica em 23,14% de 350 amostras de leite de búfalas examinadas. Destas, 51 (63%) foram leveduras e 30 (37%) fungos. As leveduras mais comumente isoladas foram *Candida*

albicans (33,3%), *Candida krusei* (25,5%), *Candida tropicalis* (15,7%), *Candida parapsilosis* (13,7%), *Candida guilliermondii* (5,9%), *Trichosporon* spp. (3,9%) e *Rhodotorula* spp. (2%). Dos fungos isolados predominaram: *Aspergillus niger* (33,3%), *Aspergillus fumigatus* (23,3%), *Mucor* spp. (13,3%), *Aspergillus flavus* (6,7%) e *Penicillium* spp. (3,3%).

Os constituintes celulares do leite têm recebido atenção especial no decorrer das pesquisas em mastite. Tradicionalmente, a interpretação tem sido baseada no número total de células somáticas, neutrófilos são as células predominantes no leite mastítico, seguidos por linfócitos, células epiteliais e monócitos (Dhakal *et al.*, 1992).

Em estudo realizado no Estado de Pernambuco, Meirelles (1997) encontrou uma média de $34,76 \times 10^3$ na CCS, para amostras positivas ao exame bacteriológico. A mesma autora verificou que existe tendência a diminuição na CCS à medida que aumenta o número de lactações.

Singh & Ludri (2001) determinaram as variações na CCS no leite de búfalas negativas ao CMT influenciadas pelo momento da ordenha, estágio de lactação, parição e sazonalidade. Não houve diferença estatística entre momento da ordenha (manhã e tarde) o que sugere que não há variação diurna existente na CCS no leite. Coeficientes de correlação significativos entre CCS durante diferentes estágios de lactação e parição sugerem que CCS por mL de leite foi mais alta durante os últimos estágios de lactação. A CCS foi baixa durante o inverno e no período quente-seco mas mostrou-se elevada durante o período quente-úmido.

Há variação considerável na contagem de leucócitos entre leite proveniente de úberes com mastite subaguda e crônica. Diminuição na

contagem leucocitária de acordo com a cronicidade do processo e evolução das lesões histopatológicas (Behra & Dwivedi, 1982).

O monitoramento periódico do perfil de sensibilidade dos patógenos causadores de mastite é de grande importância, devido à grande variabilidade etiológica dos agentes possibilitando, desta forma, a orientação para terapia adequada, pois as decisões terapêuticas são comumente realizadas de forma empírica ou baseadas em informações prévias de sensibilidade para o rebanho em questão (Owens *et al.*, 1997; Bezek, 1998).

A sensibilidade *in vitro* de microrganismos isolados de mastite bubalina foi estudada por Mitra *et al.* (1995) que verificaram maior sensibilidade a ciprofloxacina, lincomicina, cloranfenicol, norfloxacina e ampicilina associada a cloxacilina para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* spp..

Saini *et al.* (1994) avaliaram amostras de estafilococos isolados de mastite subclínica bubalina e obtiveram excelentes resultados para antibióticos como gentamicina e cloranfenicol e resultados insatisfatórios frente à penicilina e à cloxacilina. Os autores atribuem a alta sensibilidade frente àqueles antibióticos ao fato de serem menos prescritos pelos veterinários, e à baixa sensibilidade destes pelo uso prolongado e indiscriminado no tratamento de diversas enfermidades nos animais, resultados similares foram obtidos por Chaudhry *et al.* (1994).

Muhammad *et al.* (1997) testaram 39 microrganismos, dentre eles o *Staphylococcus aureus*, frente a seis diferentes antimicrobianos um alto percentual destes microrganismos (97,4%) apresentaram-se sensíveis a cefalexina, seguida pela gentamicina (94,9%) e norfloxacina (89,7%). Obtiveram uma taxa de cura de 78,4% (29 quartos de 37 com mastite clínica)

para os quartos tratados com cefalexina por quatro dias consecutivos, sendo estes quartos negativos ao exame bacteriológico.

A enrofloxacin, derivado da fluorquinolona, foi avaliada no tratamento da mastite bubalina por Kumar & Thakur (2000). Doses diárias por via intramamária (IMM) e intramuscular (IM) foram administradas durante cinco dias. Houve efetividade de 83,33% quando a administração foi concomitante (IMM e IM) e de 66,67% quando a administração foi apenas IMM.

A sensibilidade *in vitro* de microrganismos isolados de mastite bubalina foi estudada por Mitra *et al.* (1995) que verificaram maior sensibilidade a ciprofloxacina, lincomicina, cloranfenicol, norfloxacina e ampicilina associada a cloxacilina para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* spp..

Saini *et al.* (1994) avaliaram amostras de estafilococos isoladas de mastite subclínica bubalina e obtiveram excelentes resultados para antibióticos como gentamicina e cloranfenicol e resultados insatisfatórios frente à penicilina e à cloxacilina. Os autores atribuem a alta sensibilidade frente àqueles antibióticos ao fato de serem menos prescritos pelos veterinários, e à baixa sensibilidade destes pelo uso prolongado e indiscriminado no tratamento de diversas enfermidades nos animais. Resultados similares foram obtidos por Chaudhry *et al.* (1994).

A susceptibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de leite mastítico à antimicrobianos foi descrita por Muhammad *et al.* (1995) onde 100% das cepas analisadas foram resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina, seguida pela penicilina e eritromicina e da mesma forma todas foram sensíveis a norfloxacina e gentamicina.

A *Escherichia coli* é um anaeróbio facultativo predominante na microbiota intestinal do homem e de outros animais, usualmente estão confinadas ao lúmen intestinal. Os sorotipos mais característicos de *E. coli* são: enterotoxigênica (ETEC). produtoras de enterotoxinas ST e LT, enterohemorrágica (EHEC) incriminada na colite hemorrágica humana sendo associada ao consumo de hambúrguer mal cozido, enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e enteropatogênica (EPEC) que apresenta fator de aderência à células epiteliais o BFP(Bundle-forming pilus – Figura 1) (Nataro & Kaper, 1998).

Bradley & Green (2001) ressaltam que estudos prévios identificaram a habilidade da *E. coli* persistir no úbere bovino, entretanto este fenômeno tem sido considerado relativamente raro ou de pouca importância clínica. Demonstraram que a *E. coli* apresenta grande facilidade em acessar a mama durante o período de estiagem e persistir, somente ressurgindo como causadora de doença clínica posteriormente.

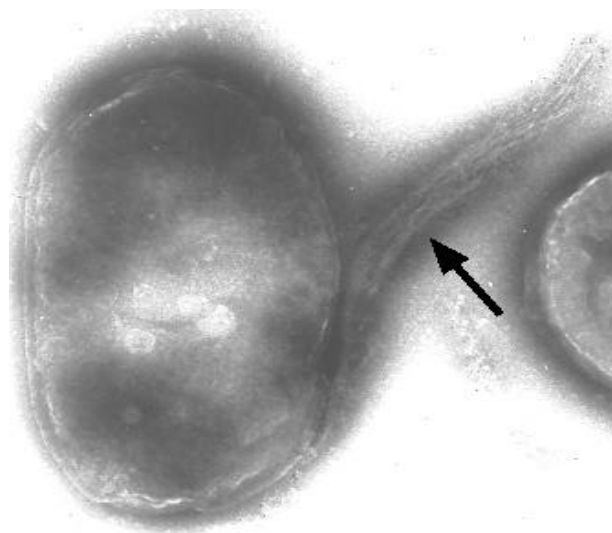


Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica do BFP em *Escherichia coli* enteropatogênica (Salton & Kim, 2001).

A principal fonte de intoxicação alimentar estafilocócica de origem animal é considerada segundo Bergdoll (1989), o leite de animais mastíticos, principalmente quando este é utilizado na fabricação de queijos sem a utilização de tratamento térmico adequado.

A modificação enzimática de antibióticos que rendem na sua ineficácia é um importante mecanismo de resistência desenvolvido por bactérias, que modificam e hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos. *Staphylococcus aureus* produtores de β -lactamase poderão inativar cerca de 100.000 moléculas de benzilpenicilina por minuto (McKeegan *et al*, 2002).

Aumento na prevalência de cepas de bactérias gram-negativas principalmente de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), de codificação plasmidial, derivada das β -lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) tem sido verificado nos últimos dez anos, estas possuem ação hidrolítica ampliada a todos os β -lactâmicos incluindo cefalosporinas de quarta geração (Barbosa *et al.*, 1999/2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de proteínas de cadeia simples com peso molecular de 26000 a 30000 Daltons. De acordo com a sua individualidade sorológica são divididas em : A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H e I. A base utilizada nos testes para detecção de enterotoxinas é esta individualidade sorológica (Munson *et al.*, 1998).

A síndrome do choque tóxico (TST) foi inicialmente descrita em 1978, como uma enfermidade que acometia adolescentes do sexo feminino, principalmente no período menstrual, originando febre, exantema generalizado, hipotensão, acometimento de vários órgãos e descamação da pele, sendo causada mais comumente pela toxina do choque tóxico (TSST-1), entretanto

outras toxinas como as enterotoxinas B (EEB) e C (EEC) podem determinar esta síndrome (Schmitz *et al.*, 1998).

A TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples com a capacidade de estimular a proliferação inespecífica de células T e induzir a produção de interleucina –1, IF γ e TNF (Ikejima *et al.*, 1988; Ellis *et al.*, 1993).

Em 1986, Jones & Wieneke relataram a primeira descrição de detecção da TSST-1 em amostras de origem animal e sua associação em casos severos de mastite bovina.

No Brasil, Cardoso *et al.* (2000) descreveram pela primeira vez a produção de TSST-1 por amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.

Amostras de origem mamária que produzem esta toxina podem induzir a liberação de citocinas e promover a inflamação do tecido mamário ou acentuar a cronicidade da doença (Kenny *et al.* 1993).

A sensibilidade do teste de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA) foi demonstrada por Fujikawa & Igarashi (1988) onde detecta-se até 0,5 ng de toxina por mL de leite, entretanto a especificidade pode estar prejudicada principalmente em decorrência da proteína A, caracterizando reação inespecífica pela aglutinação de todos os tipos de antitoxinas sensibilizadas com o látex, inclusive o controle sem a antitoxina.

Objetivos

3. OBJETIVOS

- Avaliar a frequência de mastite clínica e subclínica em rebanhos bubalinos procedentes de municípios do estado de São Paulo;
- Estudar a frequência dos agentes etiológicos isolados e caracterizá-los;
- Realizar a técnica de Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF) e citologia de expressão (CE) na mama de búfalas com ou sem mastite clínica e subclínica e concordar os achados citológicos com o grau de inflamação da glândula, agente etiológico envolvido e outras provas de diagnóstico;
- Investigar a relação entre a contagem de células somáticas no leite, reação ao California Mastitis Test, reação ao Whiteside e contagem de bactérias aeróbias mesófilas;
- Pesquisar a presença de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas e toxina do choque tóxico e caracterizar as cepas de *Escherichia coli* isoladas no leite pela reação em cadeia de polimerase (PCR) ;
- Avaliar a sensibilidade antimicrobiana das cepas bacterianas isoladas pela técnica de difusão em discos e a capacidade de produção de β -lactamase para *S. aureus* e *E. coli* .

Material e Método

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 PROPRIEDADES

Durante a realização do experimento foram visitadas sete propriedades leiteiras, localizadas nos municípios de Jaú, Botucatu e Sorocaba, com média de 50 búfalas em lactação, sendo que em seis propriedades a ordenha era realizada mecanicamente e apenas uma utilizava a manual, todas as propriedades realizavam pré e pós “dipping”.

4.2 AMOSTRAGEM/ANIMAIS

Foram utilizadas 137 búfalas, perfazendo um total de 548 quartos mamários, das raças Murrah e Mediterrâneo, de diferentes idades, estágios de lactação e mantidas com o mesmo sistema de manejo semi-intensivo.

Os animais do estudo foram submetidos ao exame clínico da glândula mamária pela inspeção dos quartos mamários e ao diagnóstico da mastite clínica pela prova da Caneca Telada e subclínica pelo “California Mastitis Test” (CMT) segundo Schalm e Noorlander (1957). Os dados clínicos e biométricos de cada animal foram registrados em fichas individuais onde constam a idade, estágio de lactação, número de partos e a média de produção de leite.

4.3 COLHEITA DE AMOSTRAS

Dos quartos mamários positivos e negativos ao CMT foram colhidas amostras de 10 mL de leite em frascos estéreis e identificados com o nome ou número do animal, respectivo quarto, após prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e antissepsia do óstio do teto com álcool a 70⁰ GL. As amostras assim caracterizadas foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e imediatamente encaminhadas ao laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de

Biociências da UNESP-Botucatu-SP, onde foram realizados os estudos microbiológicos e o teste de "Whiteside" modificado (WM), segundo Murphy e Hanson (1941). Para a determinação da Contagem de células somáticas (CCS) colheu-se em torno de 50 mL de leite em frascos plásticos contendo 44 mg do conservante dicromato de potássio, encaminhando-se o material ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Mastite do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –UNESP-Botucatu.

4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Após a colheita das amostras conforme item 4.3, as mesmas foram homogeneizadas e submetidas à contagem de células através de processamento eletrônico e automático pelo Somacount 300¹.

4.5 CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHAS FINAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Para os estudos de citologia aspirativa por agulhas finas (CAAF), após a colheita das amostras de leite e nova higienização e secagem do úbere com papel toalha, realizou-se a antissepsia da pele com álcool iodado embebido em algodão no local da punção, segundo Rocha (1998). Foram analisados pela citologia aspirativa 100 animais, perfazendo um total de 400 quartos mamários.

Com o auxílio de agulhas hipodérmicas (30x7mm) e seringas plásticas descartáveis, citoaspirador² e lâminas histológicas com extremidade fosca, procedeu-se a punção e o esfregaço do material na lâmina, sendo estas imediatamente identificadas e fixadas em metanol e álcool a 95⁰ GL e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de

¹ Bentley Instruments®

² Citoaspirador de Valeri- MPJ -Equip. Médicos Ltda.

Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu-SP onde realizou-se a coloração pelas técnicas de GIEMSA e SHORR e montagem das lâminas para posterior análise. Nos estudos microscópicos foram avaliadas as características de esfoliação, composição e tamanho celular, além da observação do padrão de cromatina e nucléolos, presença e morfologia dos agentes envolvidos. As lâminas coradas com Giemsa e montadas, no total de 548, foram submetidas à contagem de dez campos em microscópio de leitura óptica (acoplado a lente milimetrada (1mm)), onde calculou-se a média, para classificação do tipo da inflamação quanto ao componente celular. A classificação do tipo de inflamação foi realizada segundo Cowell & Tyler (2002) considerando como processo agudo quando >70% das células inflamatórias são neutrófilos, sub-agudo ou crônico ativo quando 50% a 70% das células inflamatórias são neutrófilos e crônico quando > 50% das células são macrófagos, quando a contagem de neutrófilos não foi representativa a amostra foi considerada como negativa para inflamação.

4.6 CITOLOGIA DE EXPRESSÃO

Foram analisadas 37 búfalas em lactação, perfazendo um total de 148 quartos mamários. O procedimento utilizado foi adaptado baseando-se em Azíra (1976), no qual após posterior antisepsia do teto mamário com álcool a 70⁰ GL realizava-se leve pressão neste com os dedos indicador e polegar, esfoliando-se todo o canal do teto. O material obtido era disposto em lâminas histológicas com extremidade fosca, a partir daí seguia-se o mesmo protocolo descrito no item 4.5.

4.7 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

4.7.1 Contagem do Total de Bactérias Aeróbicas Mesófilas

Esta determinação foi realizada conforme as normas estipuladas pelo Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Richardson, 1985) utilizando-se o Standard Plate Count Agar (Oxoid) como meio de cultura padrão e diluições decimais de cada amostra na diluição de 10^{-1} a 10^{-7} em solução de salina fosfatada tamponada estéril. Da série de placas semeadas para cada amostra, foram selecionadas para contagem aquelas que apresentaram entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias (UFC) e os resultados foram expressos em UFC/mL.

4.7.2 Isolamento e Identificação de Microrganismos

De cada amostra, semeou-se alíquotas de 0,1 mL em placas contendo Columbia Agar Base (Oxoid) adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (AS), MacConkey Agar-(MA) (Oxoid), Sabouraud Dextrose Agar (SDA)-(Oxoid) e Mycosel Agar (MyA) (Oxoid), as quais foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Para a caracterização do crescimento de fungos, as placas de DAS e de MyA foram também adicionalmente mantidas por 14 dias em temperatura ambiente.

Os agentes isolados foram identificados pelas características morfológicas de suas colônias, morfotintoriais pela técnica de GRAM e provas bioquímicas gerais e específicas para bactérias de acordo com Quinn *et al.* (1994) e através de microcultivos corados com azul de algodão para fungos, conforme Lacaz (1998).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE *S. aureus*

O estudo da capacidade de linhagens de *S. aureus* isoladas de leite bubalino em produzir as enterotoxinas A-D e a toxina do Choque Tóxico TSST-1 foi realizado pela técnica da Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA),

utilizando-se os kits comerciais SET (A-D) RPLA³ e o Kit TSST-RPLA⁴ (Figura 2). Procedeu-se a técnica de “celofane over night” utilizada por Robins *et al.* (1974), para obtenção do sobrenadante, resultante da lavagem sobre as culturas crescidas em papel celofane previamente esterilizados, como produto final para análise das linhagens toxigênicas. Posteriormente procedia-se a filtragem dos sobrenadantes, antecipadamente acondicionados em eppendorf e mantidos a uma temperatura de -16°C , com membranas⁵ de porosidade entre 0,2 a 0,45 μm . O filtrado constituiu a amostra a ser analisada na pesquisa das enterotoxinas A, B, C e D (EEA,EEB, EEC e EED) e toxina do choque tóxico (TSST-1). A técnica foi utilizada seguindo recomendações do fabricante e o resultado foi considerado positivo quando ocorria a reação de aglutinação, mantendo-se sempre o controle negativo das amostras testadas.



Figura 2 – Kit RPLA (Oxoid) utilizado para pesquisa de cepas toxigênicas de *S. aureus*.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS

³ SET-RPLA TD 900-Oxoid Toxin Detection Kits

4.9.1 Isolamento e caracterização bioquímica

As amostras isoladas de *Escherichia coli* foram identificadas bioquimicamente pelos meios: Escola Paulista de Medicina (EPM), Motilidade, Indol e Lisina (MILi) e citrato de Simmons, após confirmação estas foram estocadas em agar nutriente e mantidas à temperatura ambiente para posterior análise.

4.9.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

4.9.2.1- Preparo do lisado e componentes da PCR

As amostras previamente isoladas do leite de búfalas, foram semeadas em placas de Petri contendo agar nutriente (Oxoid) e incubadas por 18 horas, a 37°C em aerobiose. Logo após, transferiu-se uma colônia de cada cepa para tubo de polipropileno (0,5 mL), contendo Trisma base-EDTA (T.E.) e salina estéril, homogeneizando-se a mistura com o auxílio de um Vórtex⁶, aquecendo-se à temperatura de 95°C, por dez minutos, e imediatamente, centrifugando-se a 12.851 g, por cinco minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido em alíquotas de 5 µl para tubos de polipropileno e congelado a – 20°C até o momento da reação (SONG *et al.*, 2000).

Os componentes da reação foram misturados em câmara asséptica, onde distribuiu-se alíquotas de 45µl em tubos de polipropileno de 0,5 ml. Posteriormente, 5 µl do lisado de cada amostra foram adicionados. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo *Minicycler*⁷. Para cada reação, utilizou-se uma amostra controle-negativa e uma controle-positivo, correspondente ao marcador genético de virulência (MGV) pesquisado

⁴ TSST-RPLA TD 940-Oxoid Toxin Detection Kits

⁵ Millipore

⁶ Tremolyne ®

(Quadro 1).

Determinou-se para as amostras isoladas utilizando a técnica de PCR os seguintes MGv: pAA de EAEC, *Shiga cytotoxin 1 e 2 (stx)* produzidas pelas EHEC, gene *E. coli attachment and effacing (eae)* de EPEC e EHEC, *bundle-forming pilus (bfpA)* gene de EPEC, *invasion-associated locus (ial)* de EIEC e gene para ST-I (*stI*) e para LT-I (*eIt*), enterotoxinas das ETEC.

Quadro 1 - Representação dos componentes da PCR para análise das amostras de *E. coli* isoladas de leite bubalino

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	5 µl	1x
10 mM dNTP mix	1 µl	0,2 mM
50 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,5 mM
Taq DNA Polimerase (5U/µl)	0,25 µl	2,5 U
H ₂ O Mili-Q estéril*	29,25 - 25,5 µl	—
Iniciadores (10 µM)*	2,5 - 4,5 µl	0,5 µM
DNA – Molde	5 µl	—
Total	50µl	—

* Volume varia de acordo com o gene pesquisado

4.9.2.2- Primers e amplificação

Os primers utilizados, bem como os fragmentos amplificados, número de ciclos e o tempo e a temperatura de desnaturação, anelamento e extensão são apresentados no Quadro 2.

⁷ MJ Research ®

4.9.2.3- Eletroforese

Após a amplificação o produto final foi separado mediante eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Uma alíquota de 5 µl de DNA foi misturada a 5 µl de tampão de amostra e colocado no gel. O tempo de corrida foi de aproximadamente uma hora, a 100 Volts e 40 mA. Tratando-se em seguida, o gel por dez minutos com solução de brometo de etídio (1 µg/ml) e posteriormente levando-se ao transluminador ultra-violeta para visualização da corrida. O padrão de tamanho molecular utilizado foi 100 pb DNA *ladder*.

4.10- SOROLOGIA PARA *E. COLI*

Para todas as cepas de *E. coli* analisadas utilizou-se soros polivalentes (PROBAC^{®8}) na identificação dos sorogrupos, estes constituídos de anticorpos contra antígenos O e superficiais do tipo K. As amostras foram diluídas em uma gota de solução fisiológica e misturadas a uma gota de soro-polivalente, para o sorogrupo em questão, segundo metodologia recomendada pelo fabricante. A reação positiva caracteriza-se pela observação na formação de aglutinação completa do material na lâmina (Figura 3). Nas amostras reagentes adotou-se o mesmo processo com soro monovalente indicado pelo fabricante para a determinação precisa do sorogrupo.

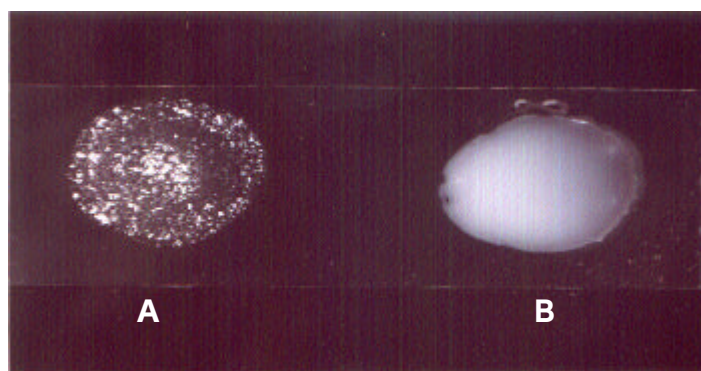


FIGURA 3 – Reação sorológica para identificação de antígenos somáticos (O) de *E. coli*. A: resultado positivo; B: resultado negativo

⁸ PROBAC DO BRASIL[®] – Produtos Bacteriológicos Ltda.

Quadro 2 - Características da PCR utilizada na detecção dos genes de *E. coli* isoladas de leite bubalino

GENES/PRIMERS	FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Literatura
<i>elt</i> 1-5' – GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC – 3' <i>elt</i> 2-5' – CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC - 3'	696 pb	30	94°C / 1 min	56°C/1 min	72°C/1 min	Olsvik & Strockbine, (1993)
<i>stx</i> 1-5' -TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG - 3' <i>stx</i> 2-5'-CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT ACC - 3'	147 pb	30	94°C / 1 min	55°C/1 min	72°C/1 min	Olsvik & Strockbine, (1993)
<i>eae</i> 1-5' - ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC - 3' <i>eae</i> 2- 5' -GAT CGC CAA CAG TTT CAC CTG - 3'	815 pb	35	94°C / 1 min	56°C/1 min	72°C/2 min	Gannon <i>et al.</i> (1993)
<i>bfp</i> A 1-5' - AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC - 3' <i>bfp</i> A 2-5'- GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA - 3'	330 pb	29	94°C / 30 s	56°C/1 min	72°C/1 min	Gunzburg <i>et al.</i> (1995)
<i>ial</i> 1- 5' - CTG GTA GGT ATG GTG AGG – 3' <i>ial</i> 2-5' - CCA GGC CAA CAA TTA TTT CCC-3'	320 pb	26	94°C / 1 min	43°C/2 min	72°C/1 min	Frankel <i>et al.</i> (1990)

Quadro 2 - Características da PCR utilizada na detecção dos genes de *E. coli* isoladas de leite bubalino (continuação)

GENES/PRIMERS	FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Literatura
<i>stx</i> 1-5 – TTT ACG ATA GAC TTC TCG ACC - 3'	227 pb	35	94 ⁰ C / 1 min	48 ⁰ C/3 min	72 ⁰ C/4 min	Fratamico <i>et al.</i> (1995)
<i>stx</i> I 1-5 – CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC - 3'						
<i>paa</i> 1-5' - CTG GCG AAA GAC TGT ATC ATC-3'	630 pb	30	94 ⁰ C / 40 s	53 ⁰ C/1 min	72 ⁰ C/1 min	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
<i>paa</i> 2-5' - CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT - 3'						

4.11 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

A sensibilidade antimicrobiana das linhagens bacterianas foi avaliada pela técnica de difusão da droga em discos no agar Mueller Hinton (MHA)⁹, conforme Bauer *et al.* (1966). Nesse sentido foram utilizadas as drogas em referência: ampicilina* (10mcg), cefalotina* (30 mcg), eritromicina* (15 mcg), penicilina* (10 UI), oxacilina* (1mcg) e tetraciclina* (30 mcg) de acordo com as sugestões da NCCLS /documento M31-P (1994), além do cefoperazone* (75 mcg), gentamicina* (10mcg), enrofloxacina* (5mcg), Meticilina¹⁰ (5mcg) e Amoxilina + Ac. Clavulônico¹¹ (70 mcg) todas obtidas comercialmente de indústrias farmacêuticas multinacionais. O estudo de cada linhagem obedeceu ao seu emprego em cultura pura com 18 horas de incubação a 37 °C observando-se o padrão da densidade óptica da escala de McFarland. A partir do preparo das suspensões bacterianas, estas foram semeadas em MHA e posteriormente, os discos contendo antibióticos foram dispostos nas placas e estas incubadas a 37⁰C por 24 horas, efetuando-se a leitura com base na medida dos halos formados o que determinou a sensibilidade ou resistência da cepa analisada.

4.12 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE β - LACTAMASE

A capacidade de produção de β -lactamase das linhagens de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* foi avaliada pelo uso do teste cromogênico com discos cefinase¹². As colônias eram semeadas na superfície dos discos e considerou-se positivo a ocorrência da tonalidade

⁹ Difco

* CECON

¹⁰ OXOID

¹¹ BBL

¹² BBL

rosa a vermelha verificada na superfície e negativo a ausência de coloração. Utilizou-se como controle positivo *Neisseria gonorrhoeae* e como controle negativo *Haemophilus influenzae*.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Avaliou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo, índice Kappa e concordância (análise da concordância entre os testes analisados) para a citologia aspirativa por agulhas finas e a citologia de expressão frente provas padrões utilizadas no exame subclínico da mastite bubalina, utilizou-se o WIN EPISCOPE 1.0 e o teste de Qui-quadrado para cada prova padrão (χ^2) (Tyler & Cullor, 1989).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Ao exame do CMT nenhuma búfala apresentou reação +++, 11 búfalas apresentaram reação positiva ++ (em quartos diferentes), representando 2,0% do total de quartos mamários estudados, e 12 búfalas apresentaram reação positiva + (em quartos diferentes) representando 2,2% do total de quartos mamários estudados (Gráfico 1). O “WhiteSide” modificado (WSM) revelou uma positividade em 10 quartos mamários ou 1,82% do total de quartos estudados, observando-se uma correlação entre CMT positivo e WSM positivo em sete (07) quartos mamários.

Do total de quartos mamários examinados oito (08/2,18%) quartos apresentaram contagem de células somáticas (CCS) superiores a 500.000 células / mL de leite (Tabela 3) e 59 (10,77%) resultado positivo ao exame microbiológico (Gráfico 2). Foram isolados 71 agentes bacterianos e dois (02) fúngicos, sendo eles em número de amostras: *Staphylococcus aureus* (seis/??%), *Estafilococos* Coagulase Negativa (ECN) (35/??%) sendo estes: *Staphylococcus epidermidis* (15), *S. simulans* (sete), *S. saprophyticus* (quatro), *S. hominis* (dois), *S. warneri* (um), *S. haemolyticus* (três), *S. caprae* (um), *S. lugdnensis* (um), *S. capitis* (um) e *S. xylosus* (um), *Streptococcus agalactiae* (duas), *Enterobacter agglomerans* (dois), *Klebsiella pneumoniae* (seis), *Klebsiella oxytoca* (uma), *Pseudomonas aeruginosa* (três), *Micrococcus* spp. (três) *Escherichia coli* (sete), *Serratia marcencens* (uma), *Bacillus* spp. (dois) e *Corynebacterium aquaticum* (dois). Foram isolados dois (02) fungos classificados por meio de microcultivo e coloração específica em *Aspergillus fumigatus*. A contagem do total de bactérias aeróbicas mesófilas revelou que onze (11/ 2,00%) amostras apresentaram valores incontáveis à diluição 10^{-1} , sete (07/ 1,28%) amostras à diluição 10^{-2} e quatro (04/ 0,73%) em diluição de 10^{-3} . Apenas oito (08) amostras apresentaram contagens

até diluição de 10^{-4} (Tabela 2). As demais amostras não referidas na tabela, não apresentaram contagens significativas dentro do proposto na metodologia.

Na análise das lâminas procedentes da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) avaliou-se a composição (células inflamatórias, epiteliais e mesenquimais) e tamanho celular. As características de esfoliação e observação dos padrões nucleares foram analisadas nas lâminas coradas pelo método de Shorr, sendo que nas 548 lâminas avaliadas não foram observadas alterações referentes a composição e padrão nucleares e estruturais nas células presentes, exceto em algumas lâminas onde se observou características reacionais com relação a mudança na morfologia da membrana nuclear e características de nucléolo (número e tamanho); as observações referentes a cada lâmina e seu quarto mamário correspondente, bem como resultados obtidos no CMT, WhiteSide modificado (WSM) e Contagem de Células Somáticas (x 1000/mL de leite) estão dispostas na Tabela 1 (anexo).

Na Contagem de Células Somáticas (x 1000/mL de leite) valores iguais a zero não se relacionam à ausência de células e sim a valores inferiores a 1000 células por mL de leite e, portanto, não são detectados pelo equipamento de contagem.

Todas as búfalas apresentavam-se no terço médio da lactação e não apresentavam histórico de mastite clínica, perda de quartos mamários, bem como histórico de abortos ou outros distúrbios reprodutivos e apenas seis (06) apresentaram histórico de mastite subclínica em lactação anterior.

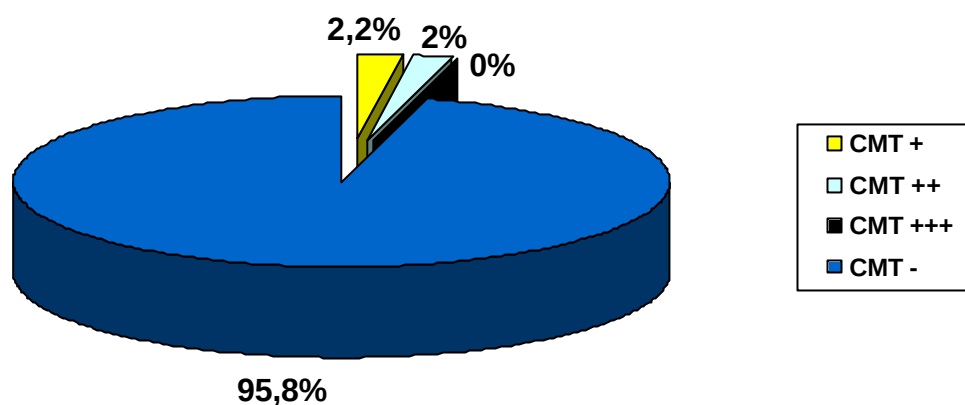


Gráfico 1 – Percentual de quartos mamários de búfalas reagentes e negativos ao exame de CMT.

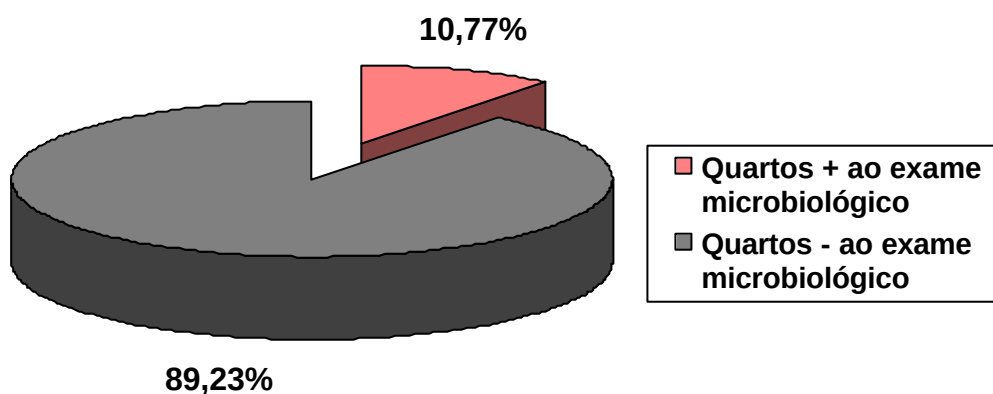


Gráfico 2 – Percentual de quartos mamários de búfalas positivos e negativos ao exame microbiológico do leite.

Tabela 2 – Distribuição das contagens do total de bactérias aeróbicas mesófilas (amostras com intervalo de 25-250 UFC/mL) procedentes de amostras de leite de búfalas de acordo com as diluições utilizadas

Animal/ Quarto	Contagem UFC/mL / Diluições									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
27 AD	Inc*.	28	01	-	-	-	-	-	-	-
34 AE	Inc*.	Inc*.	12	07	-	-	-	-	-	-
34 AD	Inc*.	Inc*.	14	03	-	-	-	-	-	-
34 PE	Inc*.	Inc*.	Inc*.	28	-	-	-	-	-	-
38 AD	Inc*.	50	11	08	-	-	-	-	-	-
38 AE	Inc*.	Inc*.	27	06	-	-	-	-	-	-
39 AD	29	03	01	-	-	-	-	-	-	-
39 PE	45	07	-	-	-	-	-	-	-	-
40 PE	87	14	-	-	-	-	-	-	-	-
48 PE	Inc*.	Inc*.	33	01	-	-	-	-	-	-
49 AD	Inc*.	16	01	-	-	-	-	-	-	-
51 AD	30	02	-	-	-	-	-	-	-	-
61 AD	100	30	04	01	-	-	-	-	-	-
69 AE	80	20	02	-	-	-	-	-	-	-
69 PD	Inc*.	Inc*.	20	01	-	-	-	-	-	-
95 AE	Inc*.	Inc*.	130	16	-	-	-	-	-	-
102 PE	Inc*.	59	20	03	-	-	-	-	-	-

* Incontáveis

Tabela 3 – Contagem de células somáticas (CCS) de 548 amostras de leite, distribuídas entre diferentes classes de escores do “Califórnia Mastitis Test” (CMT).

Escores do CMT	Nº de amostras	CCS (x 1000/mL)	
		Mínimo	Máximo
-	525	01	1254
+	12	18	720
++	11	30	692

Do total de 489 (89,23%) quartos negativos ao exame microbiológico 482 (88,50%) não apresentaram inflamação e sete (1,43%) apresentaram inflamação do tipo aguda. Nos quartos que foram positivos ao exame microbiológico (59/10,76%), 40 (7,3%) não apresentaram inflamação, 17 (3,1%) inflamação do tipo aguda e uma (0,2%) tipo sub-aguda.

Das seis (06) linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas três (03) determinaram inflamação do tipo aguda, uma (01) sub-aguda e duas (02) não determinaram inflamação e das sete linhagens de *Escherichia coli* seis não determinaram inflamação e apenas uma associada a *Serratia marcescens* levou a inflamação do tipo aguda.

A análise da CAAF frente a outros testes padrões utilizados no diagnóstico da mastite bubalina (CMT, Microbiológico, WSM e CCS) encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4- Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Esp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), concordância (Conc), índice Kappa e Qui quadrado (χ^2) para CMT, CCS, WSM e exame microbiológico (Micro) em relação a CAAF de 400 amostras de leite e punção em mama de búfalas

Teste	Sens	Esp	VPP	VPN	Conc (%)	Kappa	χ^2 *
CMT	36,84	95,20	28,00	96,74	92,40	0,279	0,0000479
WSM	46,15	95,01	24,00	98,10	93,10	0,285	0,0000412
CCS	39,28	96,17	18,42	95,39	92,10	0,373	0,0000001
Micro	33,33	97,94	72,00	90,24	89,10	0,404	0,0000000

*Qui-quadrado com Exato de Fisher

Diante dos resultados verifica-se que o “WhiteSide” modificado é um teste de baixa sensibilidade, entretanto dos teste analisados apresentou o melhor índice de sensibilidade e ótima especificidade (detecção de animais realmente negativos) em relação a CAAF. O exame microbiológico apresentou o maior índice de especificidade seguido da CCS e CMT, entretanto apresentou o menor índice de sensibilidade em relação a CAAF. Segundo a classificação do índice Kappa (Thrusfield, 1995) todos os testes (padrões) analisados apresentaram baixa concordância com a CAAF ($\text{kappa} < 0,8$) sendo o exame microbiológico o que apresentou o maior índice Kappa. A CAAF demonstrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada com todas as provas padrões para diagnóstico de mastite.

A análise estatística da Citologia de expressão (CE) frente à outros testes no diagnóstico da mastite bubalina (CMT, Microbiológico, WSM e CCS) foi impossibilitada pela presença apenas de amostras classificadas como

negativa, entretanto ao se analisar a Tabela 5, verifica-se que há um alto índice de concordância entre a CE negativa com as demais provas padrões, desta forma pode-se inferir que a especificidade da citologia de expressão é de 100%.

Tabela 5 – Amostras negativas obtidas na Citologia de Expressão frente a testes padrões para o diagnóstico da mastite bubalina

Teste		Citologia de Expressão	Total
CMT	+	02	148
	-	146	
WSM	+	148	148
	-	00	
CCS	+	02	148
	-	146	
Micro	+	06	148
	-	142	

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* toxigênicos pelo método de RPLA para as enterotoxinas A (EEA), B (EEB), C (EEC), D (EED) e toxina do choque tóxico (TSST-1) está demonstrada na Tabela 6. Verifica-se que todas as amostras foram positivas para pelo menos uma toxina.

Tabela 6 – Resultado da pesquisa de toxinas pelo método RPLA em graus de aglutinação em amostras de *S. aureus* isoladas de leite bubalino

Amostras	EEA	EEB	EEC	EED	TSST-1
01AE ₁	-	-	-	-	+
04 PE ₁	-	-	-	-	+++
13.2	-	-	-	-	+
08 PE	-	-	-	-	+++
09 PE	+	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+

Os resultados das amostras de *Escherichia coli* isoladas e identificadas bioquimicamente e submetidas a Reação em Cadeia de Polimerase para a pesquisa dos marcadores genéticos de virulência bfp A, eae, st I, st x, ial e pAA são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado da Reação em Cadeia de Polimerase e eletroforese para marcadores genéticos de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de leite bubalino

Amostras	Marcadores Genéticos de Virulência						
	bfp A	eae	st I	elt	st X	ial	pAA
Controle	+	+	+	+	+	+	+
01 AE ₂	-	-	-	-	-	-	-
12 PE ₁	-	-	-	-	-	-	-
37 b	-	-	-	-	-	-	-
37 c	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-
47.1	-	-	-	-	-	-	-
47.2	-	-	-	-	-	-	-

Todas as amostras de *E. coli* foram submetidas a sorologia para identificação dos sorogrupos com uso de soros polivalentes, apenas duas amostras (47.1 e 47.2) aglutinaram para o soro enteropatogênica clássica A, entretanto estas quando submetidas a reação com soro monovalente (O 26, O 55, O 111, O 119) não reagiram.

Foram analisados ao exame de antibiograma 72 agentes bacterianos. *Staphylococcus aureus* isolados do leite de búfalas apresentaram uma maior sensibilidade para os antibióticos: Meticilina (100%), Amoxilina + Ácido clavulônico (100%), Cefalotina (84%) e Gentamicina (67%) e resistência total à Ampicilina, Penicilina e Oxacilina. Para *Escherichia coli* obteve-se maior sensibilidade bacteriana para Enrofloxacina (100%), Gentamicina (100%) e Cefoperazone (100%), resistência parcial à Tetraciclina (42,86%) e resistência total aos demais antimicrobianos utilizados. Para os demais agentes bacterianos obteve-se como o antibiótico de maior sensibilidade no grupo dos Estafilococos Coagulase Negativa (ECN) a Gentamicina (88%) e o que determinou maior resistência foi a Penicilina (100%). Para as enterobactérias isoladas a Enrofloxacina (100%) e Gentamicina (83,2%) demonstraram os melhores resultados quanto a sensibilidade e a Ampicilina (100%), Cefalotina (100%) e Tetraciclina (85%) os maiores índices de resistência para as bactérias analisadas.

A capacidade de produção de β -lactamase pelas seis amostras de *S. aureus* demonstrou que 83% (05) foram produtoras e sete amostras de *E. coli* obteve-se 57% (04) das amostras produtoras.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Não foram observados durante a coleta das amostras, casos de mastite clínica nos rebanhos estudados. Esta observação pode ser um achado comum, tendo em vista que a literatura referente a mastite bubalina trata com muito mais frequência a mastite subclínica (Saini *et al.*, 1994; Mitra *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 1996; Naiknaware *et al.*, 1998). Neste estudo os animais pertenciam a diferentes raças (Murrah e Mediterrâneo), com variados número de partos e mesmo sistema de criação (semi-intensivo) e apresentavam-se em torno da 2^a a 3^a lactação, período considerado crítico para o surgimento de infecções intramamárias (Láu *et al.*, 1986), o que não interferiu desta forma no aparecimento da mastite clínica, considerando ainda que no histórico dos rebanhos raramente relatava-se a ocorrência desta forma de infecção.

A mastite subclínica apresentou uma frequência de 16,8% do total dos quartos mamários estudados, índice muito inferior quando comparada a espécie bovina, mas encontra-se de acordo com Mitra *et al.* (1995) que obtiveram resultados de 21,96% para búfalas na Índia, Prasad *et al.* (1996) encontraram índices de 10-15% para vacas e búfalas estudadas e Naiknaware *et al.* (1998) conseguiram resultados de prevalência em torno de 28,63%. No Brasil, Vianni *et al.* (1990) obtiveram prevalência por quarto mamário de 8,80% e Oliveira (1997) em 196 quartos mamários estudados encontraram uma prevalência de 26,6% no Estado de Pernambuco. A baixa prevalência encontrada em estudos com mastite bubalinageralmente se justifica pela influência de fatores anatômicos tais como esfíncter do teto mais musculoso, mama com abundância de tecido muscular, além de fatores como altos níveis de lactoferrina e lactoperoxidase no leite bubalino, importantes proteínas com atividades antimicrobianas e que devem ser

considerados como importantes contribuintes nos baixos índices de mastites em búfalas.

Dentre os métodos indiretos utilizados para o diagnóstico da mastite bubalina observou-se que o “California Mastitis Test” (CMT) apresentou uma ótima especificidade (95,20%), ou seja, na detecção dos animais realmente negativos, entretanto apresentou uma baixa sensibilidade (36,84%) (detecção de animais realmente positivos) o que pode ser explicado pela baixa frequência de animais reagentes ao CMT (4,20%), em concordância com os achados de Costa *et al.* (1997a) que obtiveram 5,8% de mastite subclínica com 6,75% de CMT positivos no terço médio da lactação. Apresentou a melhor correlação com o teste “Whiteside” modificado (WSM) e a menor com o exame microbiológico. A correlação positiva entre CMT e WSM fundamenta-se no objetivo de ambos, baseados no conteúdo celular presente na amostra, e apesar da escassez de estudos com WSM em mastite bubalina este achado está de acordo com Lau *et al.* (1986) que afirmaram ter resultados semelhantes entre CMT, WSM e teor de cloretos, conferindo a estes credibilidade para o diagnóstico da mastite clínica bubalina.

Vianni *et al.* (1990) consideraram que o CMT para diagnóstico da mastite bubalina é extremamente eficiente, entretanto justificam que os achados do estudo são semelhantes aos de outros para a espécie bovina. Sabe-se que a composição do leite bubalino difere em muitos aspectos do bovino, principalmente no teor de gordura e proteínas onde o leite bubalino é mais rico, portanto é oportuno considerar-se este fator quando da avaliação de um método de diagnóstico para mastite e principalmente ter o cuidado ao extrapolar para uma comparação com outras espécies. Oliveira (1997) verificou uma baixa sensibilidade (26,6%) e razoável especificidade (64,9%) para o teste de CMT na análise de 196 amostras de leite. Considerando-se que o CMT estima o conteúdo de células somáticas (células

epiteliais e leucócitos polimorfonucleares) presentes no leite, onde são estabelecidos escores indicativos do grau de inflamação da mama, é um teste interpretado subjetivamente, da mesma forma que o WSM, este deve ser cautelosamente avaliado. Alterações no conteúdo celular podem variar em diversas situações, principalmente no que se refere a estágios de lactação, entretanto neste estudo esta variável não ocorreu pois todos os animais analisados encontravam-se no terço médio da lactação. Tijare *et al.* (1999) relacionaram diversos testes indiretos para a detecção de mastite subclínica em búfalas e o teste de condutividade elétrica apresentou uma melhor correlação com o exame microbiológico com uma eficácia de 92,3% contra 67,2% do CMT.

A baixa correlação entre o CMT e o exame microbiológico pode estar relacionada ao fato mencionado por Hassan *et al.* (1984) que a presença de bactérias nem sempre é indicativo de infecção mamária, levando-se em consideração a presença das não patogênicas que possam habitar a glândula mamária desta espécie.

A Contagem de Células Somáticas (CCS), baseada no número total de células somáticas presentes no leite, tem recebido pelos pesquisadores em mastites, atenção especial. Observamos neste estudo valores mínimos de 0×10^3 cél./mL de leite a valores máximos de 1254×10^3 cél./mL. A média geral para CCS obtida foi de $170,26 \times 10^3$ cél./mL, levando-se em consideração que foram poucas amostras com valores maiores que 250.000 cél./mL de leite, entretanto as poucas que com valores superiores a 500.000 cél./mL elevaram a média total. Estes resultados discordam em se considerando média total dos valores obtidos por Meirelles (1997) em Pernambuco de $34,95 \times 10^3$ cél./mL, e não corresponde ao limite de variação observado por Vianni *et al.* (1997) que estabeleceram intervalo de $14,1 \times 10^3$ cél./mL a $49,0 \times 10^3$ cél./mL para o leite de búfalas. Entretanto aproxima-se do resultados

obtidos por Singh & Lundri (2001) de $135,0 \times 10^3$ cél./mL. Deve-se ressaltar que valores considerados como zero na CCS não implica na ausência de células na amostra, apenas o conteúdo celular está abaixo de valores possíveis de serem detectados pelo aparelho Somacount 300®. Prasad *et al.* (1996) relataram valores em 93% das búfalas analisadas que não superaram 250.000 cél./mL de leite, cerca de 3 a 4% apresentaram contagens entre 250.000 a 500.000 cél./mL e apenas 2% apresentaram contagens superiores a 500.000 cél./mL. Encontrou-se, neste estudo, um total de 93,43% de amostras com CCS abaixo de 250.000 cél./mL, novamente corroborando com os resultados obtidos por Prasad *et al.* (1996) e acima daqueles citados por Meirelles (1997) que relatou que 97,52% das amostras apresentaram CCS abaixo de 250.000 cél./mL de leite. Segundo Singh & Ludri (2001), variações na CCS no leite de búfalas negativas ao CMT podem ser influenciadas pelo momento da ordenha, estágio de lactação, parição e sazonalidade, entretanto verificaram não haver diferenças estatísticas quanto ao momento da ordenha (manhã ou tarde) e quanto aos diferentes estágios de lactação concluindo que a CCS foi mais alta durante os últimos estágios de lactação, o que não pode-se inferir neste estudo pois os animais apresentavam-se entre a 2ª e 3ª lactação e as amostras foram obtidas apenas em um único período climático ou estação do ano (inverno). Prasad *et al.* (1996) ressaltam também que a CCS deve ser determinada e analisada regionalmente e considerando-se as condições ambientais de cada país.

A baixa CCS nas amostras analisadas no estudo está em concordância com as provas de CMT e WSM revelando uma concordância entre elas, juntamente com o exame microbiológico, Citologia Aspirativa por Agulhas finas (CAAF) e Citologia de Expressão (CE).

Ao exame microbiológico 10,77% dos quartos mamários analisados foram positivos e 89,23% negativos, achados que não estão de acordo com o relatado por

Kapur *et al.* (1992) que encontraram uma positividade de 73,96% em 868 amostras de leite de búfalas analisadas, sendo o *Staphylococcus aureus* (26,30%) o mais prevalente nas amostras analisadas e Mahmoud (1990) que examinando 483 amostras individuais de quartos aparentemente normais em búfalas encontrou positividade em 166 (34,3%) amostras. Diferiram também dos resultados obtidos por Saini *et al.* (1994) que obtiveram uma positividade de 76,13% nas amostras analisadas, Oliveira (1997) que obteve 70,9% de amostras positivas para um total de 196 amostras analisadas e de Meirelles (1997) que obteve uma positividade ao exame bacteriológico em 77 (44,51%) amostras do total de 173 analisadas. A diferença de resultados entre amostras bacteriológicas positivas do presente estudo com relação aos demais autores pode ter como fundamento a maneira como foi conduzido o trabalho, variações nos ecossistemas, sistemas de manejo e métodos de coletas diferentes, fatores estes que podem elevar ou reduzir o nível de contaminação nos rebanhos bubalinos.

Por outro lado, os achados deste estudo estão de acordo com o obtido por Vianni *et al.* (1997) que encontraram um índice de 12,19% de amostras bacteriológicas positivas e 87,81% de amostras negativas.

O agente etiológico mais freqüente isolado nas amostras analisadas foi o *Staphylococcus epidermidis* (21,43%), seguido pelo *Staphylococcus simulans* e *Escherichia coli* (10%) e *Klebsiella pneumoniae* e *Micrococcus* spp. (8,58%). A importância dos estafilococos coagulase negativa (ECN) em produzir infecções intramamárias tem aumentado ao longo do tempo. Antes considerava-se os ECN como agentes de pouca importância, entretanto, atualmente inúmeros estudos em diferentes espécies demonstraram a associação destes com várias afecções e dentre elas a mastite, portanto considera-se que os achados de duas (02) amostras

de *S. epidermidis* isoladas, associadas a CMT ++ e CAAF com citologia compatível para inflamação aguda da mama, sejam causadoras de mastite bubalina.

Kapur *et al.* (1988) obtiveram como agente mais prevalente isolado de amostras de leite bubalino o *Staphylococcus epidermidis* (19,10%) obtido de 868 quartos mamários, o que corrobora com este estudo onde este também foi o agente mais freqüente. Costa *et al.* (1997) ressalta o aumento global nas infecções intramamárias por estafilococos coagulase negativa (ECN), coliformes e *Staphylococcus aureus* e uma queda na infecção por *Streptococcus agalactiae*, concordando com a freqüência de isolamento neste estudo de apenas 2,86%, e que este fato deve-se a grande difusão no uso de antibióticos para tratamento das mastites. Langoni *et al.* (1994) isolaram 30,5% de *S. epidermidis* do total de 154 amostras de leite analisadas. Saini *et al.* (1994) encontraram 17,14% de ECN, entretanto o agente mais prevalente foi o *S. aureus* (48,57%), o que discorda do resultado do presente estudo, de apenas 8,57% das amostras bacteriologicamente positivas. Quando considera-se apenas o gênero tem-se larga concordância com Saini *et al.* (1994), Mitra *et al.* (1995), Meirelles (1997), Oliveira (1997) e Naiknaware *et al.* (1998), discordando destes apenas quando se referem ao *Streptococcus* spp., como segundo agente mais isolado.

Dentre outras espécies de ECN, isolou-se *S. simulans* (10%), *S. saprophyticus* (5,71%), *S. haemolyticus* (4,28%), *S. hominis* (2,86%), *S. caprae* (1,43%), *S. lugdnensis* (1,43%), *S. xylosus* (1,43%), *S. capitis* (1,43%) e *S. warneri* (1,43%). A presença de tais agentes pode estar relacionada ao fato de que todas estas espécies fazem parte da microbiota da pele humana, e apesar dos cuidados na antisepsia do teto, algumas espécies apresentam um grau de aderência relativamente forte às células epiteliais da derme. Estudos mais aprofundados e em

maiores quantidades no aspecto de isolamento de ECN em leite bubalino são necessários para que haja novas perspectivas de discussões sobre o assunto.

A *Escherichia coli* foi o segundo agente mais isolado perfazendo total de 10% das amostras analisadas, concordando com Kapur *et al.* (1988) com 6,5%, Saini *et al.* (1994) que isolaram 11,42%, Muhammad *et al.* (1995) e Naiknaware *et al.* (1998).

Muhammad *et al.* (1995) fazem pertinentes observações quanto a mastite desencadeada pela *E. coli*, onde levantam a questão do hábito aquático dos búfalos, que eleva o índice de contaminação por agentes ambientais como é o caso da *E. coli* e da *Klebsiella pneumoniae* que neste estudo foi isolada em 8,58% das amostras analisadas, podendo estar associado ao alto índice de isolamento destes agentes. Outros autores (Kapur *et al.*, 1988; Naiknaware *et al.*, 1998) referem-se ao isolamento da *Klebsiella* spp. em amostras de leite bubalino, entretanto com menor frequência que o encontrado neste estudo.

E. coli tem demonstrado grande habilidade de infectar a glândula mamária de bovinos durante o período seco e permanecer nesta, ressurgindo apenas na fase de lactação ocasionando mastites (Bradley & Green, 2001), isto deve-se a adaptação e estreita relação com o tecido mamário, sendo correlacionada por Dopfer *et al.* (2001) a achados de inflamação crônica e fibrose verificada histologicamente, o que não verificou-se neste estudo, pela CAAF.

Procedeu-se com as amostras de *E. coli* isoladas, a pesquisa de marcadores genéticos de virulência (MGV) para pAA de EAEC (enteroagregativa), stX 1 e 2 de EHEC (enterohemorrágica), *eae* de EHEC e EPEC (enteropatogênica), *bfpA* de EPEC, *ial* de EIEC (enteroinvasiva) e LT-I (*elt*) e ST-I (*stI*) de ETEC (enterotoxigênicas) pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e todas as amostras foram negativas para todos MGV pesquisados. Na sorologia das sete amostras analisadas apenas duas aglutinaram para o soro enteropatogênica

clássica A, mas não reagiram quando submetidas ao soro monovalente, o que não invalida o estudo, pois não há referências sobre a caracterização de amostras de *Escherichia coli* de origem bubalina necessitando-se de outras pesquisas nesta área para poder-se avaliar que cepas estão presentes nesta espécie, que apresenta hábitos tão distintos dos demais ruminantes domésticos.

Staphylococcus aureus foi isolado em 8,57% das amostras analisadas, não sendo considerado portanto, o principal agente etiológico, concordando com Langoni *et al.* (1994) e Oliveira (1997) que isolaram respectivamente 4,9% e 5,3% e inferior aos 16,3% obtido por Kapur *et al.* (1988).

O *S. aureus* é considerado agente contagioso da glândula mamária, sendo caracterizado por uma variedade de fatores de virulência que levam a danos no tecido mamário, por apresentarem mecanismos de escape contra o sistema imune e neutralizar a atividade de diversos antimicrobianos (Piccinini & Zecconi, 2001). O baixo índice de isolamento deste agente neste estudo, pode estar relacionado diretamente ao manejo adotado para espécie bubalina, porém segundo Godden *et al.* (2002) a sensibilidade da cultura bacteriológica para detecção de mastites aumenta com o número de UFC/mL na amostra de leite, principalmente em se tratando de *S. aureus*. Obteve-se apenas 17 amostras que foram selecionadas por corresponderem a contagens de 25 a 250 UFC/mL, sendo a máxima diluição obtida de 10^{-4} , e dentre estas apenas duas amostras de *S. aureus* apresentaram-se dentro deste intervalo. As demais não atingiram o valor mínimo considerado. Srivasan & Singh (1988) relatam contagens em diluições de 10^{-3} até 10^{-8} durante o verão e contagens mais baixas durante o inverno, o que de certa forma pode ter interferido neste estudo pois as coletas foram realizadas quase totalmente no inverno. A ausência de estudos referindo-se a contagens bacterianas em amostras

de leite bubalino dificulta a discussão de parâmetros que possam esclarecer dúvidas neste aspecto.

S. aureus pode expressar diferentes tipos de toxinas que são provavelmente responsáveis e determinantes da sintomatologia que ocorrerá durante uma infecção. Dentre estas toxinas destacam-se as enterotoxinas (EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE e EEG) e a toxina do choque tóxico (TSST-1) que são consideradas superantígenos causando ativação e proliferação de linfócitos T. As enterotoxinas ocasionam intoxicações alimentares que são relativamente freqüentes. Estas intoxicações são normalmente seguidas por vômitos, náuseas, cólicas abdominais e diarreias em humanos. São termorresistentes, portanto o tempo de cocção normal e as temperaturas utilizadas na rotina doméstica não são suficientes para eliminá-las (Cunha *et al.*, 1996). A Síndrome do Choque Tóxico foi descrita primeiramente em 1978 por Todd *et al.*, é uma enfermidade de múltiplos sistemas, caracterizada por uma síndrome clínica em humanos, mais verificada em mulheres durante a menstruação. O leite mastítico assume grande importância na produção de enterotoxinas e TSST-1 por tornar-se um excelente meio de cultura para o *S. aureus* associado a temperatura ideal da glândula mamária (Cardoso, 2000).

Vários estudos foram conduzidos para pesquisa de enterotoxinas e TSST-1 em bovinos (Freitas & Magalhães, 1990; Cardoso, 2000; Sá, 2000) e caprinos (Valle *et al.*; 1991), entretanto para a espécie bubalina praticamente não há estudos.

A detecção de enterotoxinas e da TSST-1 é decisiva na determinação da toxigenicidade das linhagens. Diferentes técnicas são utilizadas como o Placa de Ótima Sensibilidade (OSP), Radioimunoensaio, ensaio imunoenzimático (ELISA), Hemaglutinação reversa passiva (RPHA) e Aglutinação em látex (RPLA)(Cunha *et al.*, 1996).

O RPLA, técnica de escolha utilizada neste estudo apresenta boa sensibilidade e vantagem de eliminar procedimentos de extração e não requerer equipamentos especializados, entretanto algumas reações inespecíficas podem ocorrer dependendo do componente alimentar analisado, tais reações não foram observadas no presente estudo. Todas as amostras de *S. aureus* analisadas produziram toxinas, sendo que cinco produziram TSST-1 e uma a EEA. Estes achados são de fundamental importância pois não encontrou-se na literatura nacional até então, referências sobre a presença de toxinas estafilocócicas obtidas no leite bubalino. Revela-se também a importância desta toxinas para saúde pública, pois 100% das amostra aglutinaram em escores de até +++ e levando-se em consideração que elas são termorresistentes e não são inativadas pela temperatura de fervura normal do leite utilizada nos ambientes domésticos, há necessidade de realização de outros estudos com diferentes cepas de *S. aureus*. Neste estudo, encontrou-se apenas duas amostras associadas a quadros de mastite subclínica com CMT e CAAF positivos, as demais amostras não apresentaram reação ao CMT e à CAAF.

A presença de seis (8,58%) amostras de *Klebsiella pneumoniae* chama a atenção, pois em bovinos estas mastites ambientais são economicamente importantes, a porta de entrada destes agentes na glândula mamária se dá pelo teto e os sinais clínicos são associados com endotoxinas produzidas pelos patógenos. Descreve-se também a ocorrência de bacteremia (Silva & Costa, 2001). O fato dos bubalinos terem por ambiente preferencial terrenos alagadiços e lama contribui para os surgimento de mastites subclínicas, visto que as amostras estão relacionadas com alterações ao CMT (principalmente ++).

Outros agentes como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* spp. foram isolados em baixa frequência, respectivamente em 4,28% e 2,86% das amostras,

em concordância com Kapur *et al.* (1998) que isolaram 5,0% de *P. aeruginosa* e 1,21% de *Bacillus* spp., Saini *et al.* (1994) que obtiveram 2,85% de isolamento para *Bacillus* spp., mas discordando do obtido por Oliveira (1997) que obteve o isolamento de *Bacillus* spp. em 22,9%. De certa forma a baixa frequência de *Bacillus* spp. neste estudo revela a forma asséptica de coleta do material, pois estes são oportunistas e podem revelar o grau de contaminação de uma coleta.

A mastite micótica em búfalas tem sido relatada por alguns autores com relativa frequência. Neste estudo foram isolados duas amostras de *Aspergillus fumigatus* (2,86%), corroborando com os achados de Mahapatra *et al.* (1996), que obtiveram 2,70% de isolamento em 50 amostras de leite, para *Aspergillus* spp. incluindo principalmente o *A. fumigatus*. A frequência de fungos causadores de mastite em búfalos, associados ou não à bactérias, tem assumido certa importância mais recentemente, não apenas pelas perdas econômicas que acarretam, mas pelo aumento no consumo do leite de búfalas pelo homem. O aparecimento de fungos em amostras de leite pode estar associado à administração prolongada de antibióticos e esteróides, contaminação por infusões intramamárias, e tratamentos sem diagnóstico específico do agente envolvido. Alguns animais aparentemente sadios apresentam fungos localizados nas tetas, e estes são responsáveis pela causa posterior de mastites subclínicas. A grande influência no aparecimento destes fungos colonizando a glândula mamária deve-se ao ambiente onde vivem as búfalas, como ambientes úmidos e alagadiços que propiciam o aparecimento destes, o que pode explicar o isolamento das duas amostras neste estudo, pois estas não determinaram alterações no CMT, CCS e na CAAF.

De forma inédita, isolou-se duas cepas de *Corynebacterium aquaticum* (2,86%) em búfalas. O *C. aquaticum* foi descrito primeiramente em 1962 por

Liefson, que o isolou de água destilada, mas supõe-se que provavelmente esteja presente também em água doce. Há poucos relatos em humanos de afecções associadas ao *C. aquaticum* (Koneman *et al.*, 2001). A presença desta espécie colonizando a glândula mamária de búfalas provavelmente relaciona-se ao hábito aquático destes animais, contudo os quartos mamários afetados não apresentaram mastite subclínica e determinaram baixa CCS.

No presente estudo, os *S. aureus* isolados do leite de búfalas apresentaram uma maior sensibilidade para os antibióticos: Meticilina (100%), Amoxilina + Ácido clavulônico (100%), Cefalotina (84%) e Gentamicina (67%) em concordância com os achados de Mitra *et al.* (1995) e resistência total à Ampicilina, Penicilina e Oxacilina, discordando de Saini *et al.* (1994) que obtiveram sensibilidade de 57,14% para penicilina e 71,42% para a ampicilina. A elevada resistência das cepas de *S. aureus* à penicilina e ampicilina pode estar associada ao uso indiscriminado destas drogas ao longo dos anos e considera-se também que neste estudo cerca de 83% das cepas de *S. aureus* isoladas são produtoras de β -lactamase, fator este tão importante que quando na realização da pesquisa a associação da amoxicilina com o ácido clavulônico (inibidor de β -lactamase) obteve-se 100% de sensibilidade para tal droga.

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar e inativar antibióticos β -lactâmicos. A produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência bacteriana, principalmente das Gram-negativas, entretanto tem sido verificada em Gram-positivas, mycobacterias e nocardia, algumas são mediadas por plasmídeos e outras cromossomais. Verificou-se neste estudo associação entre uma maior sensibilidade aos antibióticos que não são β -lactâmicos ou que estejam associados a inibidores de β -lactamases como é o caso do ácido clavulônico, tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*, o que justifica-se

pela quantidade de linhagens de *S. aureus* produtoras de β -lactamases. Todas as amostras de *S. aureus* produtoras de β -lactamase foram resistentes à penicilina. A ausência de literatura neste aspecto, para amostras obtidas de leite bubalino, torna novamente necessária a realização de pesquisas comparativas esclarecedoras.

Para *Escherichia coli* obteve-se maior sensibilidade para Enrofloxacina (100%), Gentamicina (100%) e Cefoperazone (100%), resistência parcial à Tetraciclina (42,86%) e resistência total aos demais antimicrobianos utilizados como ampicilina e penicilina. A sensibilidade a um antibiótico β -lactâmico como é o caso do cefoperazone, pode ser explicada pela quantidade de amostras mais reduzidas que foram β -lactamase positivas (57%). Estes resultados estão de acordo com Praveen & Thakur (2000) que obtiveram 100% de eficácia no tratamento da mastite bubalina com a enrofloxacina e Saini *et al.* (1994) que obtiveram sensibilidade de (94,28%) para gentamicina, entretanto diferiu no resultado obtido para tetraciclina de 64,28% de sensibilidade. Chaudhry *et al.* (1994) obtiveram resultados para gentamicina de 32,69%, muito abaixo do encontrado.

Os Estafilococos Coagulase Negativa (ECN) de forma geral apresentaram sensibilidade a Gentamicina (88%), e maior resistência a Penicilina (100%). Para o grupo de enterobactérias isoladas, verificou-se maior sensibilidade a Enrofloxacina (100%) e Gentamicina (83,2%) e a Ampicilina (100%), e os maiores índices de resistência para Cefalotina (100%) e Tetraciclina (85%). Devemos considerar a grande quantidade de bactérias gram-negativas que são relatadas como potenciais produtoras de β -lactamase, com é o caso da *Klebsiella pneumoniae*, além da *Pseudomonas aeruginosa* também relatada por Rolinson (1991).

A citologia aspirativa compreende a análise microscópica de amostras obtidas na aspiração por agulhas finas e permite a caracterização de processos inflamatórios e neoplásicos. Os processos inflamatórios são diagnosticados mais freqüentemente que as neoplasias. Os tipos predominantes de leucócitos tornam possível a classificação da inflamação e sugestão de agente etiológico (Rocha, 1998; Cowell & Tyler, 2002).

No presente estudo onde foram avaliados a composição (células inflamatórias, epiteliais e mesenquimais) e tamanho celular, a CAAF, utilizada de forma inédita para espécie bubalina, revelou uma excelente especificidade (96%) quando comparada a outras técnicas de detecção de mastite utilizadas neste estudo como o CMT, WSM, CCS e exame microbiológico. Obteve-se maior índice de concordância entre a CAAF e o CMT e a CCS em conjunto, e menor índice com o exame microbiológico, o que de certa forma pode ocorrer pois deve-se levar em consideração a multiplicação de microrganismos que não necessariamente estejam causando inflamação. Verificou-se uma predominância de neutrófilos nas amostras analisadas e consideradas como positivas à inflamação, células epiteliais foram visualizadas, entretanto quando comparada a mama bovina (Domingues, 1999), observou-se a presença em menores quantidades deste tipo celular.

A sensibilidade para detecção de bactérias utilizando-se o diagnóstico citológico é comparável a cultura bacteriana, o que permite ao profissional o direcionamento mais rápido para uma terapia correta (Clinckenbeard *et al.*, 1995). Em nosso estudo obtivemos amostras na CAAF, que coradas pela técnica de Gram, que corresponderam ao resultado obtido no exame microbiológico, entretanto a presença de grande quantidade de células adiposas no material dificultava a visualização e caracterização dos agentes.

A esfoliação e observação dos padrões nucleares foram verificadas pela coloração de Shorr, que evidencia o grau de maturação celular e alterações na membrana nuclear e nucléolos, onde nas 548 lâminas avaliadas não foram observadas alterações referentes à composição e padrão nucleares e estrutural nas células presentes, exceto em algumas lâminas onde observou-se características reacionais com relação a mudança na morfologia da membrana nuclear e características de nucléolo (número e tamanho).

A citologia de expressão, ainda muito pouco utilizada em medicina veterinária, foi analisada neste estudo também de forma inédita, onde verificou-se por análise comparativa dos resultados que esta apresentou excelente índice de concordância com as outras técnicas utilizadas principalmente na detecção de animais realmente negativos para mastite. É muito importante nesta técnica, quando não há secreção espontânea, a massagem e expressão da mama para obtenção da amostra e a rápida fixação do material obtido (Azíra, 1976). Como todas as amostras analisadas foram negativas na classificação para inflamação e obtidas em quantidades menores que a CAAF, e considerando que apenas 37 animais foram analisados (148) quartos mamários, não podemos inferir comparações estatísticas, porém a análise microscópica do material observamos uma excelente celularidade semelhante a obtida na CAAF, com a vantagem de não se utilizar a agulha fina, o que facilitou o nosso estudo junto aos proprietários. A análise do Shorr com amostras obtidas de CE não apresentaram alterações dignas de nota. Consideramos a importante contribuição desta técnica para inovação do diagnóstico na mastite bubalina.

A realização de novos estudos que utilizem a citologia (CAAF e CE) como forma de diagnóstico para mastite em diferentes espécies, faz-se necessário para

que seja possibilitada uma discussão mais profunda sobre os benefícios que a técnica poderá trazer para o diagnóstico desta enfermidade.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos do presente trabalho e nas condições de realização deste, podemos concluir que:

- A frequência da mastite subclínica bubalina para as regiões estudadas foi de 16,8% nos quartos mamários avaliados, sendo o *Staphylococcus epidermidis* o agente isolado com maior frequência, perfazendo um total de 21,43% dos isolados;
- Há uma grande participação dos estafilococos coagulase negativa na colonização e associação a casos de mastites subclínicas nas búfalas estudadas;
- O CMT apresentou boa especificidade, maior correlação com o “Whiteside” modificado e menor com exame microbiológico;
- A CCS média para este estudo foi de $170,26 \times 10^3$ cél./mL de leite para os 548 quartos mamários analisados apresentando concordância com o CMT e WSM;
- A Amoxilina + ácido clavulônico, Meticilina e Cefalotina foram as drogas que determinaram maior sensibilidade para o *Staphylococcus aureus*;
- Para as linhagens de *Escherichia coli* observou-se uma maior sensibilidade à enrofloxacina, Gentamicina e cefoperazone;
- A produção de β -lactamases nas linhagens de *S. aureus* isoladas de leite bubalino é intensa;
- As linhagens de *E. coli* isoladas do leite bubalino foram negativas para os marcadores de genéticos virulência estudados;

- As amostras de *S. aureus* analisadas foram 100% toxigênicas, sendo a TSST-1 importante toxina produzida por linhagens de *S. aureus* associada ao leite bubalino;
- A CAAF apresentou excelente especificidade e concordância com CMT, WSM, CCS e exame microbiológico;
- A Citologia de Expressão apresentou comparativamente grande correlação com CMT, WSM, CCS e exame microbiológico;
- A CAAF e a Citologia de Expressão podem ser utilizadas para determinação do grau de inflamação da glândula mamária de búfalas.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHER, G.L. & PENNEL, E. Detection of methicilin resistance in *Staphylococci* by using a DNA probe. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 1720-1724, 1990.
- AZÍRA, J. **Diagnostico citologico en patologia mamaria**. Barcelona: Espaxs. p.15-25, 1976.
- BERGDOLL, M.S. Analitical Methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. Food Microbiol.**, v.10, p. 91-100, 1990.
- BRADLEY, A.J., GREEN, M.J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. **J. Cli. Microbiol.**, v.39, p.1845-1849, 2001.
- BRITO, J.R.F., CALDEIRA, G.A.V., VERNEQUE, R.S. et al. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, p.49-53, 1997.
- CARDOSO, H.F.T., CARMO, L.S., SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, p. 7-10, 2000.
- CHAUDHRY, M.A., MALIK, S.Z., AHMAD, N. et al. In vitro and in vivo evaluation of different antibiotics for the treatment of mastitis in buffaloes. **Pak. Vet. J.**, v. 14, p. 258-61, 1994.
- CHHABRA, D., MOGHE M.N., TANWANI, S.K. Prevalence of mycotic mastitis in cows and buffaloes in Madhya Pradesh. **Indian Vet. J.**, v. 73, p. 1-3, 1996.
- CHHABRA, D., MOGHE M.N., TANWANI, S.K. et al. Mycotic mastitis in buffaloes. **Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.**, v.19, p.108-9, 1998.

- CLINKENBEARD, K.D.; COWELL, R.L.; MORTON, R.J.; WALKER, D.B. et al. Diagnostic Cytology: Bacterial Infections. **The Comp. Small Anim.**, v. 17, p. 71-81, 1995.
- COSTA, E.O. da.; GARINO JR, F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R. et al. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Proceedings...** V World Buffalo Congress, Caserta, Italy . p. 631-634, 1997a.
- COSTA, E.O. da.; GARINO JR, F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R. et al. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds cows (*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira (Ribeira River Valley) São Paulo. Brazil (**Proceedings...** V World Buffalo Congress, Caserta, Italy . p. 635-638, 1997b)
- COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Prac.**, v. 19, p. 769-94, 1989.
- COWELL, R.L. ; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2^a ed. Mosby: Missouri, 2002. 260p.
- CUNHA, M.R.L.S., OLIVEIRA, T.C.R.M., HIROOKA, E.Y. Generalidades sobre enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. **Rev. Ciênc. Farm. São Paulo**, v. 17, p. 9-22, 1996.
- DeMAY, R. **The Art & Science of Cytopathology: Fine Needle Aspiration Biopsy**. Chicago: ACSPP Press, 1996. p. 464-81.
- DOMINGUES, P.F. Estudo de parâmetros de constituintes do leite e plasma sanguíneo, possível associação do polimorfismo genético-bioquímico das Beta-lactoglobulinas e transferrinas e exame citológico nas mastites bovinas subclínicas. Botucatu, 1999. 121p. **Tese** (doutorado)-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

- DOPFER, D., NEDERBRAGT, H., ALMEIDA, R.A., GAASTRA, W. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.80, p. 285-96, 2001.
- FDA **Bacteriological Analytical Manual**, 8^a ed. 1998. p. 1-29.
- FONSECA, W. **Búfalo: estudo e comportamento**. São Paulo: Editora Ícone, 1987. 405p.
- FRANKEL, G.; RILEY, L.; GIRON, J.A. et al. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. **J. Infect. Dis.**, v.161, p.1252-6, 1990.
- FRATAMICO, P.M.; SACKITEY, S.K.; WIEDMANN, M. et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.2188-91, 1995.
- FREITAS, M.A.Q., MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Ver. Microbiol. São Paulo**, v. 21, p. 315-9, 1990.
- GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K. et al. Detection and characterization of eae gene of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, p.1268-74, 1993.
- GODDEN, S.M., JANSEN, J.T., LESLIE, K.E. et al. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Can. Vet. J.**, v.43, p. 38-42, 2002.
- GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G.; TUDURY, E.A. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **Hora Vet.**, v.96, p. 15-21, 1997.

- GUNZBURG, S.T., TORNIEPORTH, N.G., RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.1375-7, 1995.
- HAMZA, P.A., CHOUDHURI, P.C. Chemoprophylactic studies on mastitis in buffaloes. **Indian J. Dairy Sci.**, v. 47, p. 723-6, 1994a.
- HAMZA, P.A., CHOUDHURI, P.C. Clinic-therapeutic studies on post parturient mastitis in primiparous buffaloes in and around Mumbai. **Indian Vet. J.**, v. 71, p. 318-21, 1994b.
- HUANG, M.B.; GAY, T.E.; BAKER, C.N.; BANNERJEE, S.N. et al. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar based dilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2683-88, 1993.
- KAPUR, M.P., SHARMA, A., BHARDWAJ, R.M. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. **Proceedings...** II World Buffalo Congress, New Delhi, India. p. 44-7, 1988.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., JR WIN, W.C. Diagnóstico Microbiológico. São Paulo: MEDSI, 2001. 1465p.
- KUMAR, P. & THAKUR, D.K. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of mastitis in buffaloes. **Indian Vet. J.**, v.77, p. 145-6, 2000.
- KUMARASINGHE, M.P. Cytology of granulomatous mastitis. **Acta Cytol.**, v. 41, p. 727-30, 1997.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 1ªed. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 1998. 445p.
- LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., MOLERO FILHO, J.R., BALDINI, S., LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bubalina subclínica.

- XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, **Anais...**p.328. Olinda. 1994.
- LÁU, H.D.; SINGH, N.P.; HESS, S.J. **Comparação de testes indiretos no diagnóstico de mastite subclínica em búfalas**. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1986. (Boletim de Pesquisa, 77).
- LEVESQUE, R.C.; MEDEIROS, A.A.; JACOB, G.A. Molecular cloning and DNA homology of plasmid mediated β -lactamase genes. **Mol. Gen. Genet.**, v. 206, p. 252-258, 1987.
- MAHAPATRA, S., KAR, B.C., MISRA, P.R. Occurrence of mycotic mastitis in buffaloes of Orissa. **Indian Vet. J.**, v. 73, p. 1021-3, 1996.
- MAHMOUD, A.A. Control of subclinical mastitis in a buffalo dairy herd using a field mastitis control program. **Assiut Vet. Med. J.**, v. 24, p.194-200, 1990.
- MARTÍNEZ-GIRÓN, R. & RIBAS-BARCELÓ, A. Algae in cytologic smears. **Acta Cytol.**, v. 45, p. 936-40, 2001.
- MEIRELLES, F.S. Mastite subclínica bacteriana e sua relação com a Contagem de Células Somáticas no leite de búfalas do estado de Pernambuco. Recife, 1997. 45p. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco
- MENÁRD, M.; FONTAINE, M.; MORIN, M. Fine needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats. **Can. Vet. J.**, v. 27, p. 504-10, 1986.
- MITRA, M., GHOSH, D., ALI, K. et al. Prevalence of subclinical mastitis in na organised buffalo farm at Haringhata. **Indian Vet. J.**, v. 72, p. 1310-1, 1995.
- MUHAMMAD, G., ATHAR, M., REHMAN, F. et al. Clinical and therapeutic aspects of *Escherichia coli* mastitis in water buffaloes. **Indian J. Dairy Sci.**, v. 48, p. 581-6, 1995.

- MUHAMMAD, G., LODHI, L.A., ATHAR, M., REHMAN, F. Evaluation of cephalixin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. **Indian J. Dairy Sci.**, v.50, p.205-8, 1997.
- MURPHY, J.M.; HANSON, J.J. A modified whiteside test for detection of chronic bovine mastitis. **Cornell. Vet.**, v. 31, p. 47-55, 1941.
- NAIKNAWARE, H.S., SHELKE, D.D., BHALERAO, D.P. et al. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes in and around Mumbai. **Indian Vet. J.**, v. 75, p. 291-2, 1998.
- NASCIMENTO, C.N.B.; MOURA CARVALHO, L.O.D.M. **Criação de Búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993. 403p.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3**. NCCLS, Villanova, Pa., 1998.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Specifications for Molecular Microbiology Methods for Infectious Diseases**. Proposed Guideline MM3, vol. 1 nº 1, NCCLS, Villanova Pa., 1994
- NICOLETTI, P. An update on selected disease which affect buffaloes. In: IV CONGRESSO MUNDIAL DE CRIADORES DE BÚFALOS, 4 1994, São Paulo. **Anais...**, p.221-8.
- OLIVEIRA, M.V.V. Exame Microbiológico do leite de búfalas e avaliação dos testes Whiteside e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite bacteriana subclínica em bubalinos. Recife, 1997. 52p. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- OLSVIK, O., STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER,

- F.C. et al. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications.** New York: Mayo Foundation, 1993. p.271-6.
- PARK, C.E. & SZABO, R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A,B,C and D in foods. **Can. Vet. J.**, v. 32, p. 723-27, 1986.
- PENNA, T.C.V., COLOMBO, A. J., ABE, L.E., MACHOSHVILI, I.A. Parâmetros de resistência térmica de cepa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênica no leite. **Rev. Farm. Bioquim. USP**, v. 24, p. 113-7, 1988.
- PICCININI, R. & ZECCONI, A. Relationship among plasmids recovered from *Staphylococcus aureus*, milk leukocytes, and antimicrobial resistance. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 2641-8, 2001.
- PRASAD, R.V.; RATHMAN, K.; SHAH, D.G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira district, India. **Indian J. Dairy Sci.**, v. 49, p. 441-7, 1996.
- PRAVEEN, K., THAKUR, D.K. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of mastitis in buffaloes. **Indian Vet. J.**, v.77, p.145-6, 2000.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology.** London: Wolfe, 648 p., 1994. 648p.
- RANUCCI, S., FRUGANTI, G., VALENTE, C. et al. Sulvalore diagnostico di alcune prove di laboratorio nella mastite subclinica della bufala. **Selez. Vet.**, v. 29, p. 495-506, 1988.
- RICHARDSON, G.H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products.** 15^aed. Washington: APHA, 1985. 412p.
- ROCHA, N.S. Citologia Aspirativa por Agulhas Finas (CAAF). **Cães e Gatos**, n. 75, p. 14-6, 1998.

ROLINSON, G.N. Evolution of β -lactamase inhibitors. **Reviews Infect. Dis.**, v. 13, p. 727-32, 1991.

SÁ, M.E.P.de Prevalência da mastite bovina, perfil de sensibilidade microbiana, e pesquisa de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas e toxina do choque tóxico. Botucatu, 2000. 124p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SAINI, S.S, SHARMA, J.K., KWATRA, M.S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbred cows and buffaloes in Punjab. **Indian J. Dairy. Sci.**, v. 47, p. 103-6, 1994.

SALTON, M.R.J., KIM, K.S. *Escherichia coli* . www.md.huji.ac.il/md, 2001.

SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **JAVMA**, v. 130, p.199-204, 1957.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.701-5, 1995.

SILVA, N. & COSTA, G.M. An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p. 401-2, 2001.

SINGH, M., LUDRI, R.S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity and season. **Asian Austr. J. Anim. Sci.**, v. 14, p. 189-92, 2001.

SINGH, P.J., SINGH, K.B. A study on economic losses due to mastitis in India. **Indian J. Dairy Sci.**, v.47, p. 265-72, 1994.

SINGH, M., LUDRI, R.S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity and season. **Asian-Austral. J. Anim. Sci.**, v. 14, p.189-192, 2001.

- SONG, Y.; KATO, N.; LIU, C. et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group – and species – specific primers derived from the 16S – 23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Lett.**, v.187, p.167-73, 2000.
- SRINIVASAN, R.A., SINGH, R.S. Microbiology of buffalo milk. **Proceedings... II** World Buffalo Congress, New Delhi, India. p. 288-301, 1988.
- THIRUNVUKKARASU, M.; PRABAHARAN, R. Epidemiologic measures of association between the incidence of mastitis and some of its predisposing factors. **Indian Vet. J.**, v. 75, p. 718-22, 1998.
- TIJARE, D.B., SINGH, V.K., CHATUTURVEDI, V.K., DHANESAR, N.S. Sensitivity of indirect tests in detection of subclinical mastitis in buffaloes. . **Indian Vet. J.**, v. 76, p. 912-5, 1999.
- TYLER, J.W., CULLOR, J.S. Titers, tests and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. **J.A.V.M.A**, v. 194, n.11, p. 1550-8, 1989.
- VAKULENKO, S.B., GERYK, B., KOTRA, L.P., MORBASHERY, S., LERNER, S.A. Selection and characterization of β -lactam- β -lactamase inactivation-resistant mutants following PCR mutagenesis of the TEM-1 β -lactamase gene. **Antimicro. Agents and Chemothe.**, v.42, p. 1542-8, 1998.
- VALE, W.G. Prospects of buffalo production in Latin America. São Paulo. Brasil (**Proceedings... IV** Congresso Mundial de Criadores de Búfalos, São Paulo, Brasil, p. 75-87, 1994).
- VALLE, J., VADILLO, S., PIRIZ, S., GOMEZ-LUCIA, E. Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by Staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. **Appl. Environ.Microbiol.**, v. 57, p.889-91, 1991.

- VARSHNEY, J.P, KAPUR, M.P., SHARMA, A. Studies on some biochemical characteristics of *Staphylococcus aureus* of buffalo mammary origin. **Comp. Immunol. Microbiol Infect. Dis.**, v. 16, p.317-21, 1993.
- VIHAN, V.S., SAHNI, K.L. Observation on efficacy of various indirect diagnostic tests for detection of sub-clinical mastitis in goats. **Indian Vet. J.**, v. 64, p. 715-6, 1987.
- VIANNI, M.C.E., NADER, A. Eficiência do “California Mastitis Test” (CMT) na estimativa do número de Contagem de Células Somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária –Jaboticabal**, v.4, p. 3-4, 1990.
- VIANNI, M.C.E., FRACALANZA, S.E.L., TEIXEIRA, M.L. Subclinical mastitis in buffalo and its influence on the physical and chemical characteristics of the milk. **Rev. Univ.Rural**, v.18, p. 456-67, 1997.
- ZAVA, M.A.R.A. **Produção de búfalos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987. 237p.

Anexos

9. ANEXOS

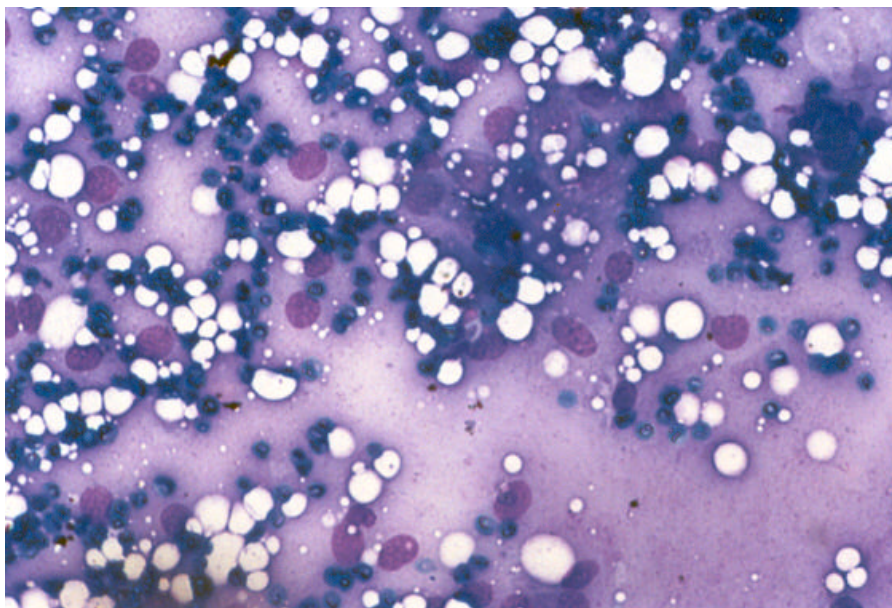


FIGURA 4 – CITOLOGIA DE EXPRESSÃO DE MAMA BUBALINA, EVIDENCIANDO (SETAS) A CELULARIDADE. GIEMSA, 400X.

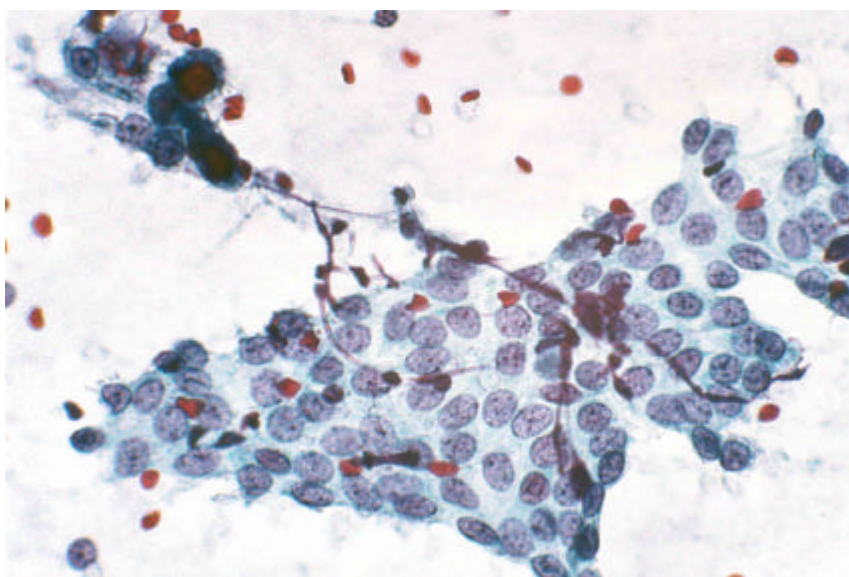


FIGURA 5 – “CLUSTER” DE CÉLULAS EPITELIAIS COM EVIDÊNCIA DOS NUCLÉOLOS OBTIDAS POR CAAF DE MAMA BUBALINA. SHORR, 400X.

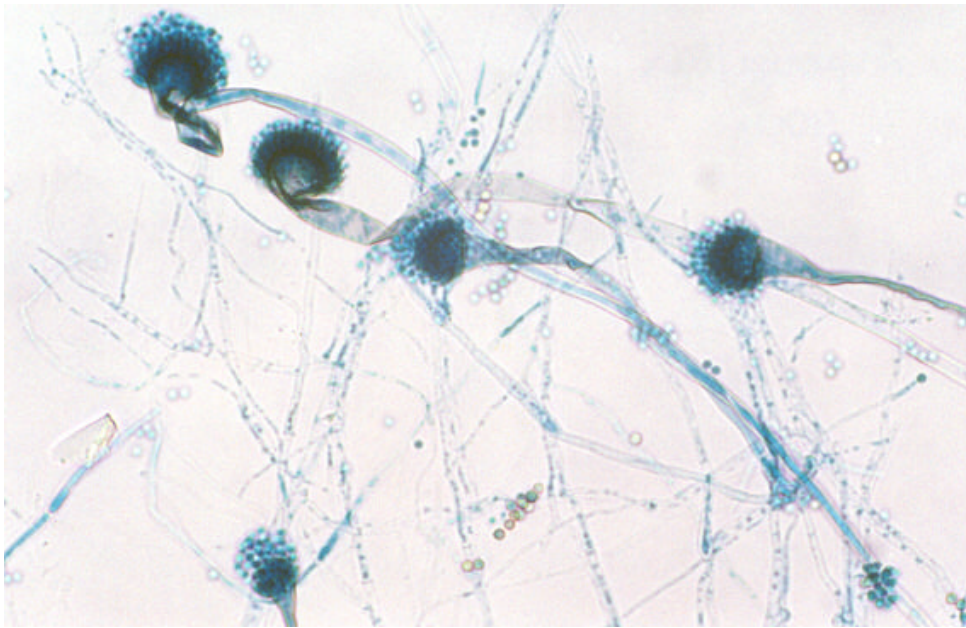


Figura 6 – *Aspergillus fumigatus* isolado de leite bubalino. Azul de Algodão, 400x.

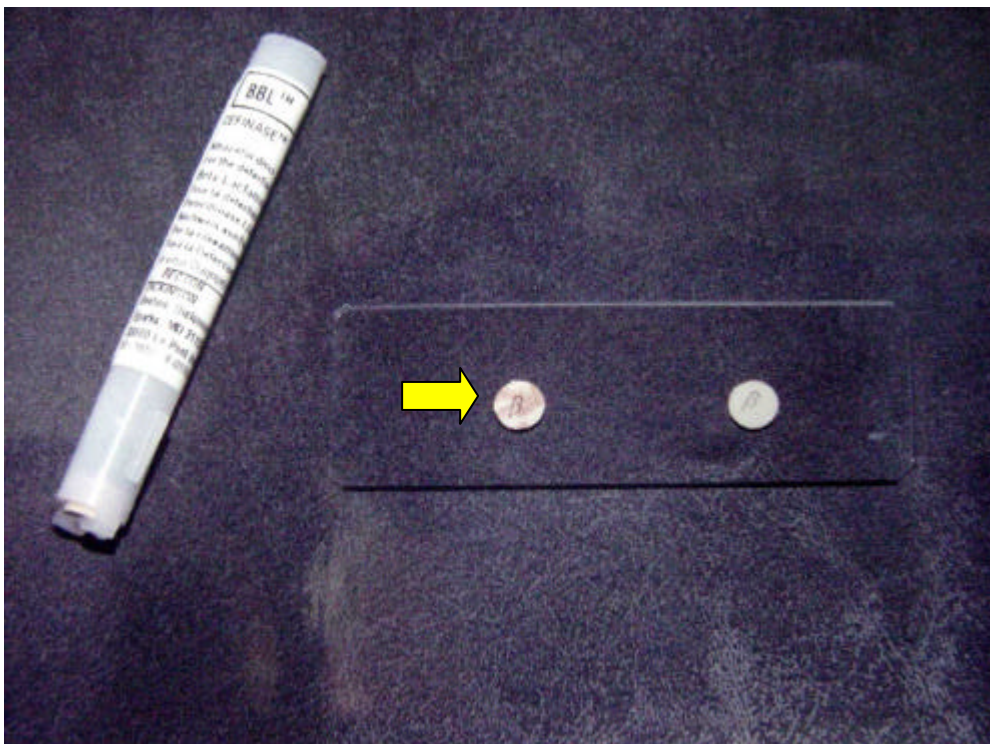


Figura 7 – Discos de Cefinase para realização do teste da produção de β -lactamase, amostras positivas apresentam coloração avermelhada (seta).



Figura 08 – Preparação do material e amostras de *Escherichia coli* para realização da PCR.



Figura 09 – Eletroforese das amostras de *Escherichia coli*.

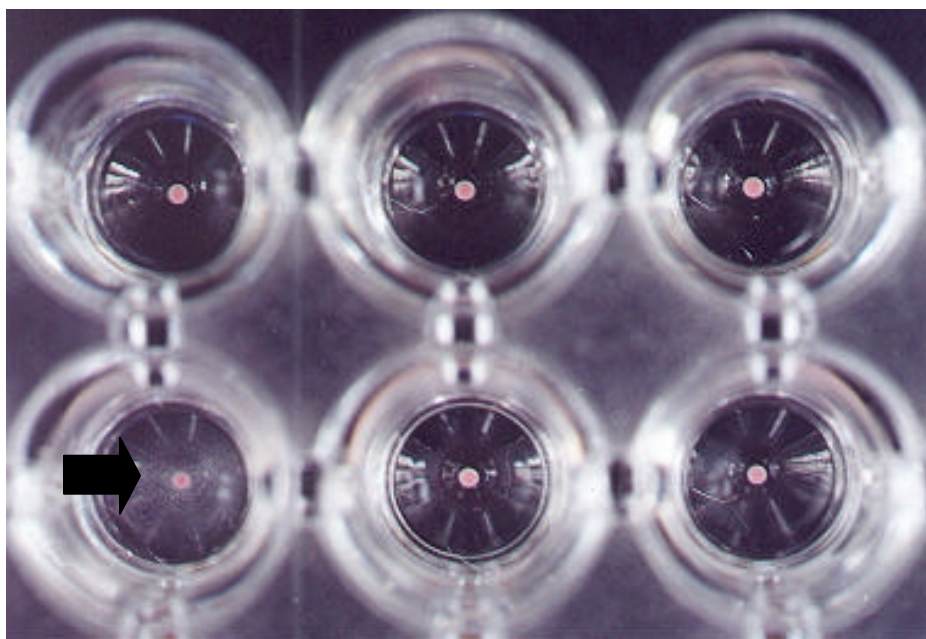


Figura 10 – Reação de aglutinação positiva (seta), para detecção de TSST-1. Técnica de RPLA.

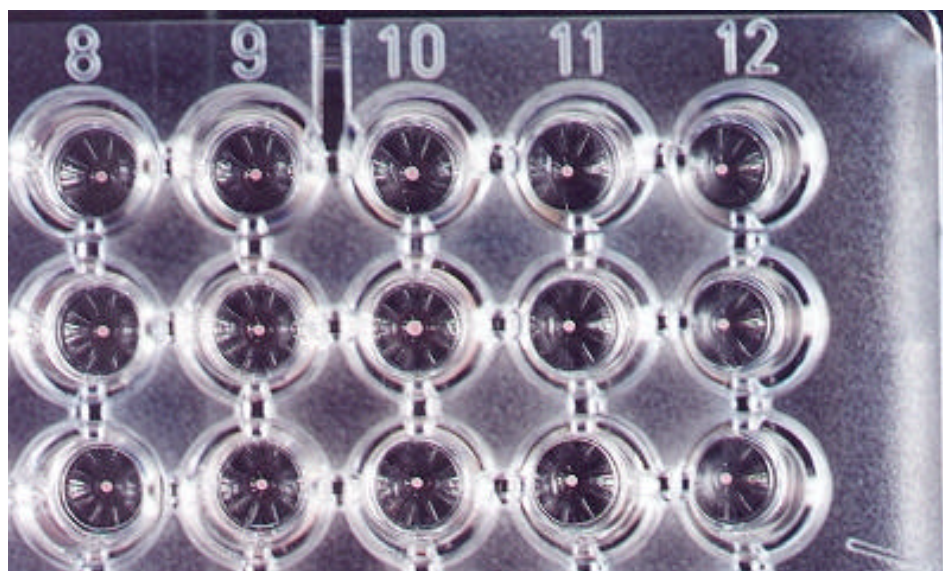


Figura 11 – Microplaca com reações negativas. Técnica de RPLA.

Componentes utilizados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Componentes (ml)	Genes						
	<i>bfpA</i>	<i>eae</i>	<i>stI</i>	<i>elt</i>	<i>stx</i>	<i>ial</i>	pAA
Tampão	40	40	40	40	40	40	40
DNTP	8 (32)	8 (32)	8 (32)	8 (32)	8 (32)	8 (32)	8 (32)
MgCl ₂	12	12	12	12	12	12	12
Primers	20 (40)	28 (56)	34/1-36/2	26 (52)	20 (40)	28 (56)	24 (48)
<i>Taq</i>	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	234	218	204	222	234	218	226
DNA molde	5	5	5	5	5	5	5

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002.

Animal/ Nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
01	AD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN ¹³
01	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
01	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
01	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
02	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
02	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
02	PD	-	-	0	Negativo	Aguda	Reativo
02	PE	-	-	0	Negativo	Aguda	Reativo
03	AD	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN
03	AE	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN
03	PD	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN
03	PE	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN
04	AD	-	-	13	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	Aguda	Reativo
04	AE	-	-	0	<i>Micrococcus</i> spp.	Aguda	Reativo
04	PD	-	-	28	Negativo	Negativo	NDN
04	PE	-	-	1254	<i>S. aureus</i>	Aguda	Reativo
05	AD	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN
05	AE	-	-	5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	NDN
05	PD	-	-	3	Negativo	Negativo	NDN
05	PE	-	-	0	Negativo	Negativo	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
06	AD	-	-	0	<i>Micrococcus</i> spp.	Aguda	Reativo
06	AE	-	-	0	<i>S. saprophyticus</i>	Negativa	NDN ¹⁴
06	PD	-	-	0	Negativo	Aguda	Reativo
06	PE	-	-	0	Negativo	Aguda	Reativo
07	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
07	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
07	PD	-	-	11	<i>E. agglomerans</i> + <i>S. agalactiae</i> + <i>K. pneumoniae</i>	Aguda	Reativo
07	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
08	AD	-	-	137	Negativo	Negativa	NDN
08	AE	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
08	PD	++	+++	462	Negativo	Negativa	NDN
08	PE	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
09	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
09	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
09	PD	-	-	0	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
09	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
10	AD	-	-	3	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>	Negativa	NDN
10	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
10	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN ¹

¹³ Nada digno de nota

¹⁴ Nada digno de nota

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal / N ^o	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
10	PE	-	-	0	<i>E. coli</i>	Negativa	NDN
11	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
11	AE	-	-	0	<i>S. simulans</i>	Negativa	NDN
11	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
11	PE	-	-	24	Negativo	Negativa	NDN
12	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
12	AE	-	-	4	<i>E. coli</i>	Negativa	NDN
12	PD	-	-	4	<i>Micrococcus</i> spp.	Aguda	Reativo
12	PE	-	-	9	Negativo	Negativa	NDN
13	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
13	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
13	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
13	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
14	AD	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
14	AE	-	-	59	<i>Serratia marcescens</i> + <i>E. coli</i>	Aguda	Reativo
14	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
14	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
15	AD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
15	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal	Quarto	CMT	WSM	CCS	Exame	CAAF	SHORR
/ N ^o	Mamário			(X1000)	Microbiológico	(Tipo de Inflamação)	
15	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
15	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
16	AD	-	-	45	<i>S. hominis</i>	Aguda	NDN
16	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
16	PD	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
16	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
17	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
17	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
17	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
17	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
18	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
18	AE	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
18	PD	-	+	300	Negativo	Aguda	Reativo
18	PE	-	+	260	Negativo	Aguda	Reativo
19	AD	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN
19	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
19	PD	++	+	456	<i>S. epidermidis</i>	Aguda	NDN
19	PE	-	+	89	Negativo	Negativa	NDN
20	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
20	AE	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
20	PD	++	-	360	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ Nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
20	PE	-	-	3	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
21	AD	+	-	162	Negativo	Negativa	NDN
21	AE	-	-	16	Negativo	Negativa	NDN
21	PD	-	-	68	Negativo	Negativa	NDN
21	PE	-	-	451	Negativo	Negativa	NDN
22	AD	-	-	06	Negativo	Negativa	NDN
22	AE	-	-	06	Negativo	Negativa	NDN
22	PD	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
22	PE	-	-	58	Negativo	Negativa	NDN
23	AD	+	-	48	Negativo	Negativa	NDN
23	AE	-	-	416	Negativo	Negativa	NDN
23	PD	-	-	288	Negativo	Negativa	NDN
23	PE	-	-	135	Negativo	Negativa	NDN
24	AD	-	-	342	Negativo	Negativa	NDN
24	AE	-	-	197	Negativo	Negativa	NDN
24	PD	+	-	286	Negativo	Negativa	NDN
24	PE	-	-	140	Negativo	Negativa	NDN
25	AD	-	-	480	Negativo	Negativa	NDN
25	AE	-	-	518	Negativo	Aguda	Reativo
25	PD	-	-	158	Negativo	Negativa	NDN
25	PE	-	-	67	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
26	AD	-	-	917	Negativo	Negativa	NDN
26	AE	++	-	692	Negativo	Negativa	NDN
26	PD	-	-	28	Negativo	Negativa	NDN
26	PE	-	-	231	Negativo	Negativa	NDN
27	AD	-	-	132	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
27	AE	-	-	40	Negativo	Negativa	NDN
27	PD	-	-	22	Negativo	Negativa	NDN
27	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
28	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
28	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
28	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
28	PE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
29	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
29	AE	++	+	380	<i>K. pneumoniae</i>	Aguda	Reativo
29	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
29	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
30	AD	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
30	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
30	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
30	PE	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
31	AD	-	-	04	Negativo	Negativa	NDN
31	AE	-	-	52	Negativo	Negativa	NDN
31	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
31	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
32	AD	-	-	04	Negativo	Negativa	NDN
32	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
32	PD	+	+	12	Negativo	Negativa	NDN
32	PE	++	-	132	<i>S. warneri</i> + <i>S. saprophyticus</i>	Aguda	Reativo
33	AD	-	-	20	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
33	AE	-	-	03	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negativa	NDN
33	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
33	PE	-	-	08	Negativo	Negativa	NDN
34*	AD	-	-	11	Negativo	Negativa	NDN
34	AE	-	-	02	<i>S. simulans</i> + <i>K. oxytoca</i>	Negativa	NDN
34	PD	-	-	06	Negativo	Negativa	NDN
34	PE	-	-	04	Negativo	Negativa	NDN
35	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
35	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
35	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
35	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
36	AD	-	-	04	Negativo	Negativa	NDN
36	AE	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN

*mastite subclínica em lactação anterior

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
36	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
36	PE	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
37	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
37	AE	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
37	PD	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
37	PE	-	-	01	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
38*	AD	-	-	54	Negativo	Negativa	NDN
38	AE	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
38	PD	-	-	43	Negativo	Negativa	NDN
38	PE	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
39	AD	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
39	AE	-	-	44	Negativo	Negativa	NDN
39	PD	-	-	10	<i>S.saprophyticus</i>	Negativa	NDN
39	PE	-	-	45	Negativo	Negativa	NDN
40	AD	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN
40	AE	-	-	22	Negativo	Negativa	NDN
40	PD	-	+	18	Negativo	Negativa	NDN
40	PE	-	-	33	Negativo	Negativa	NDN
41	AD	-	-	27	Negativo	Negativa	NDN
41	AE	-	-	04	Negativo	Negativa	NDN
41	PD	-	-	02	Negativo	Negativa	NDN
41	PE	-	-	60	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
42	AD	-	-	07	Negativo	Negativa	NDN
42	AE	-	-	06	Negativo	Negativa	NDN
42	PD	-	-	23	Negativo	Negativa	NDN
42	PE	-	-	08	Negativo	Negativa	NDN
43	AD	-	-	15	<i>A. fumigatus</i>	Negativa	NDN
43	AE	-	-	13	<i>A. fumigatus</i>	Negativa	NDN
43	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
43	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
44*	AD	-	-	494	Negativo	Negativa	NDN
44	AE	-	-	229	Negativo	Negativa	NDN
44	PD	-	-	376	Negativo	Negativa	NDN
44	PE	-	-	609	Negativo	Negativa	NDN
45	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
45	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
45	PD	-	-	0	Negativo	INegativa	NDN
45	PE	-	-	07	Negativo	INegativa	NDN
46	AD	-	-	36	Negativo	INegativa	NDN
46	AE	-	-	88	Negativo	INegativa	NDN
46	PD	-	-	30	Negativo	INegativa	NDN
46	PE	+	+	75	Negativo	INegativa	NDN
47	AD	-	-	54	Negativo	INegativa	NDN
47	AE	-	-	125	Negativo	INegativa	NDN

*mastite subclínica em lactação anterior

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ n ^o	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
47	PD	-	-	107	Negativo	Negativa	NDN
47	PE	-	-	11	Negativo	Negativa	NDN
48	AD	-	-	09	Negativo	Negativa	NDN
48	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
48	PD	-	-	17	Negativo	Negativa	NDN
48	PE	++	+	359	<i>K. pneumoniae</i>	Aguda	Reativo
49	AD	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
49	AE	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
49	PD	-	-	02	Negativo	Negativa	NDN
49	PE	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
50	AD	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
50	AE	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
50	PD	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
50	PE	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
51*	AD	++	++	300	<i>K. pneumoniae</i>	Aguda	NDN
51	AE	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN
51	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
51	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
52	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
52	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
52	PD	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
52	PE	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
53	AD	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
53	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
53	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
53	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
54	AD	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
54	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
54	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
54	PE	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN
55	AD	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
55	AE	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
55	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
55	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
56*	AD	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
56	AE	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
56	PD	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
56	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
57*	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
57	AE	+	-	210	Negativo	Negativa	NDN
57	PD	-	-	110	Negativo	Negativa	NDN
57	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
58	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

* mastite subclínica em lactação anterior

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
58	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
58	PD	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
58	PE	-	-	11	Negativo	Negativa	NDN
59	AD	-	-	130	<i>Bacillus spp.</i>	Negativa	NDN
59	AE	-	-	251	<i>Bacillus spp.</i>	Aguda	Reativo
59	PD	-	-	15	Negativo	Negativa	NDN
59	PE	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
60	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
60	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
60	PD	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
60	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
61	AD	++	+	518	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
61	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
61	PD	-	-	31	Negativo	Negativa	NDN
61	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
62	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
62	AE	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
62	PD	-	-	54	Negativo	Negativa	NDN
62	PE	-	-	61	Negativo	Negativa	NDN
63	AD	++	+	30	Negativo	Negativa	NDN
63	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
63	PD	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ n ^o	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
63	PE	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
64	AD	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
64	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
64	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
64	PE	-	-	231	<i>K. pneumoniae</i>	Aguda	NDN
65	AD	-	-	40	Negativo	Negativa	NDN
65	AE	-	-	120	Negativo	Negativa	NDN
65	PD	-	-	37	Negativo	Negativa	NDN
65	PE	-	-	01	Negativo	Negativa	NDN
66*	AD	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
66	AE	-	-	00	Negativo	Negativa	NDN
66	PD	-	-	00	Negativo	Negativa	NDN
66	PE	-	-	07	Negativo	Negativa	NDN
67	AD	-	-	100	Negativo	Negativa	NDN
67	AE	-	-	39	Negativo	Negativa	NDN
67	PD	-	-	43	Negativo	Negativa	NDN
67	PE	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
68	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
68	AE	-	-	03	Negativo	Negativa	NDN
68	PD	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
68	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ n ^o	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
69	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
69	AE	+	-	200	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	Sub-Aguda	Reativo
69	PD	++	-	720	<i>S. aureus</i> + <i>Enterobacter agglomerans</i>	Aguda	Reativo
69	PE	-	-	13	Negativo	Negativa	NDN
70	AD	-	-	10	Negativo	Negativa	NDN
70	AE	-	-	05	Negativo	Negativa	NDN
70	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
70	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
71	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
71	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
71	PD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
71	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
72	AD	-	-	0	<i>S. simulans</i>	Negativa	NDN
72	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
72	PD	-	-	1	<i>S. simulans</i>	Negativa	NDN
72	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
73	AD	-	-	5	<i>S. saprophyticus</i>	Negativa	NDN
73	AE	-	-	1	<i>S. capitis</i>	Negativa	NDN
73	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
73	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
74	AD	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
74	AE	-	-	0	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
74	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
74	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
75	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
75	AE	-	-	0	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
75	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
75	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
76	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
76	AE	-	-	1	<i>S. haemolyticus</i>	Negativa	NDN
76	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
76	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
77	AD	-	-	0	<i>S. simulans</i>	Negativa	NDN
77	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
77	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
77	PE	-	-	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa	NDN
78	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
78	AE	-	-	2	<i>S. haemolyticus</i>	Negativa	NDN
78	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
78	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
79	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
79	AE	-	-	236	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
79	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
79	PE	-	-	6	<i>S. aureus</i>	Negativa	NDN
80	AD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
80	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
80	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
80	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
81	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
81	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
81	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
81	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
82	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
82	AE	-	-	14	<i>S. haemolyticus</i>	Negativa	NDN
82	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
82	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
83	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
83	AE	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
83	PD	-	-	42	Negativo	Negativa	NDN
83	PE	-	-	25	Negativo	Negativa	NDN
84	AD	-	-	70	Negativo	Negativa	NDN
84	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
84	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
84	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
85	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
85	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
85	PD	-	-	11	Negativo	Negativa	NDN
85	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
86	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
86	AE	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
86	PD	-	-	8	Negativo	Negativa	NDN
86	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
87	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
87	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
87	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
87	PE	-	-	0	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
88	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
88	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
88	PD	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
88	PE	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
89	AD	-	-	7	Negativo	Negativa	NDN
89	AE	-	-	58	Negativo	Negativa	NDN
89	PD	-	-	25	<i>S. caprae</i>	Negativa	NDN
89	PE	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
90	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
90	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
90	PD	-	-	45	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT,8WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF (Tipo de Inflamação)	SHORR
90	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
91	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
91	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
91	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
91	PE	-	-	41	Negativo	Negativa	NDN
92	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
92	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
92	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
92	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
93	AD	-	-	22	<i>S. epidermidis</i>	Negativa	NDN
93	AE	-	-	20	Negativo	Negativa	NDN
93	PD	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
93	PE	-	-	3	<i>S. lugdnensis</i>	Negativa	NDN
94	AD	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
94	AE	-	-	66	Negativo	Negativa	NDN
94	PD	-	-	48	Negativo	Negativa	NDN
94	PE	-	-	3	<i>S. simulans</i>	Negativa	NDN
95	AD	-	-	47	Negativo	Negativa	NDN
95	AE	-	-	261	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aguda	NDN
95	PD	-	-	160	Negativo	Negativa	NDN
95	PE	-	-	163	Negativo	Negativa	NDN
96	AD	-	-	103	Negativo	Negativa	NDN
96	AE	-	-	42	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF e Citologia de expressão (CE) por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF/CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
96	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
96	PE	-	-	91	Negativo	Negativa	NDN
97	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
97	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
97	PD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
97	PE	-	-	68	Negativo	Negativa	NDN
98	AD	+	-	0	Negativo	Negativa	NDN
98	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
98	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
98	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
99	AD	-	-	141	Negativo	Negativa	NDN
99	AE	-	-	8	Negativo	Negativa	NDN
99	PD	-	-	187	Negativo	Negativa	NDN
99	PE	-	-	638	Negativo	Negativa	NDN
100	AD	-	-	18	Negativo	Negativa	NDN
100	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
100	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
100	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
101	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
101	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
101	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CAAF/CE ¹⁵ (Tipo de Inflamação)	SHORR
101	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
102	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
102	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
102	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
102	PE	-	-	1	<i>E. coli</i>	Negativa	NDN
103	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
103	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
103	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
103	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
104	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
104	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
104	PD	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
104	PE	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
105	AD	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
105	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
105	PD	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
105	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
106	AD	-	-	26	Negativo	Negativa	NDN
106	AE	-	-	31	Negativo	Negativa	NDN
106	PD	-	-	24	Negativo	Negativa	NDN
106	PE	-	-	53	Negativo	Negativa	NDN
107	AD	-	-	8	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
107	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
107	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
107	PE	-	-	17	Negativo	Negativa	NDN
108	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
108	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
108	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
108	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
109	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
109	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
109	PD	-	-	0	<i>S. hominis</i>	Negativa	NDN
109	PE	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
110	AD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
110	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
110	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
110	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
111	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
111	AE	-	-	89	Negativo	Negativa	NDN
111	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
111	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
112	AD	+	-	0	Negativo	Negativa	NDN
112	AE	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
112	PD	-	-	33	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
112	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
113	AD	-	-	124	Negativo	Negativa	NDN
113	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
113	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
113	PE	-	-	68	Negativo	Negativa	NDN
114	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
114	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
114	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
114	PE	-	-	138	Negativo	Negativa	NDN
115	AD	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
115	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
115	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
115	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
116	AD	-	-	4	<i>S. xylosus</i>	Negativa	NDN
116	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
116	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
116	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
117	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
117	AE	-	-	0	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Negativa	NDN
117	PD	-	-	8	Negativo	Negativa	NDN
117	PE	-	-	9	Negativo	Negativa	NDN
118	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
118	AE	-	-	70	Negativo	Negativa	NDN
118	PD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
118	PE	-	-	1	<i>S. aureus</i>	Negativa	NDN
119	AD	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
119	AE	-	-	8	Negativo	Negativa	NDN
119	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
119	PE	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
120	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
120	AE	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
120	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
120	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
121	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
121	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
121	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
121	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
122	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
122	AE	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
122	PD	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
122	PE	-	-	54	Negativo	Negativa	NDN
123	AD	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
123	AE	-	-	6	Negativo	Negativa	NDN
123	PD	-	-	53	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
123	PE	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
124	AD	+	-	1	Negativo	Negativa	NDN
124	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
124	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
124	PE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
125	AD	-	-	45	Negativo	Negativa	NDN
125	AE	-	-	12	Negativo	Negativa	NDN
125	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
125	PE	-	-	2	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Negativa	NDN
126	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
126	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
126	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
126	PE	-	-	3	Negativo	Negativa	NDN
127	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
127	AE	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
127	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
127	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
128	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
128	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
128	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
128	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
129	AD	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CAAF por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
129	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
129	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
129	PE	-	-	102	Negativo	Negativa	NDN
130	AD	-	-	11	Negativo	Negativa	NDN
130	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
130	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
130	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
131	AD	-	-	4	Negativo	Negativa	NDN
131	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
131	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
131	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
132	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
132	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
132	PD	-	-	5	Negativo	Negativa	NDN
132	PE	-	-	89	Negativo	Negativa	NDN
133	AD	-	-	444	Negativo	Negativa	NDN
133	AE	-	-	23	Negativo	Negativa	NDN
133	PD	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
133	PE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
134	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
134	AE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
134	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN

Tabela 1 – Resultado do exame do CMT, WSM, CCS (x1000/mL de leite), microbiológico e análise da CE por quarto mamário de búfalas. Botucatu, 2002 (continuação)

Animal/ nº	Quarto Mamário	CMT	WSM	CCS (X1000)	Exame Microbiológico	CE (Tipo de Inflamação)	SHORR
134	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
135	AD	-	-	7	Negativo	Negativa	NDN
135	AE	-	-	42	Negativo	Negativa	NDN
135	PD	-	-	189	Negativo	Negativa	NDN
135	PE	-	-	430	Negativo	Negativa	NDN
136	AD	-	-	100	Negativo	Negativa	NDN
136	AE	-	-	2	Negativo	Negativa	NDN
136	PD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
136	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
137	AD	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN
137	AE	-	-	1	Negativo	Negativa	NDN
137	PD	-	-	23	Negativo	Negativa	NDN
137	PE	-	-	0	Negativo	Negativa	NDN