

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

**PERFIL BIOQUÍMICO, CONDIÇÃO MICROBIOLÓGICA E
CELULARIDADE DO LEITE DE BÚFALAS**

Lucas José Luduverio Pizauro
Médico Veterinário

2013

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

**PERFIL BIOQUÍMICO, CONDIÇÃO MICROBIOLÓGICA E
CELULARIDADE DO LEITE DE BÚFALAS**

Lucas José Luduverio Pizauro

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária)

2013

Pizauro, Lucas José Luduverio
P695 Perfil Bioquímico, condição microbiológica e celularidade do
p leite de búfalas / Lucas José Luduverio Pizauro. -- Jaboticabal,
2013
x, 94 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: José Jurandir Fagliari

Coorientador: Márcio Garcia Ribeiro

Banca examinadora: Daniela Gomes da Silva, Luiz Paulo
Martins Filho

Bibliografia

1. *Bubalus bubalis*. 2. *California Mastitis Test*. 3. fases da
lactação. 4. microbiologia. 5. soro lácteo. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:637.12

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

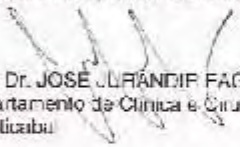
TÍTULO: PERFIL BIOQUÍMICO, CONDIÇÃO MICROBIOLÓGICA E CELULARIDADE DO LEITE DE BUFALAS

AUTOR: LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURO


ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MÁRCIO GARCIA RIBEIRO

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


Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

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


Prof. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

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


Prof. Dr. LUIZ PAULO MARTINS FILHO

Quilintas - Instituto de pós-graduação / Campinas/SP

Data da realização: 22 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS JOSÉ LUDUVERIO PIZAURO - Nascido em 22 de fevereiro de 1985 na cidade de Ribeirão Preto - SP, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal em fevereiro de 2006, concluindo-o em dezembro de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de julho de 2009 a junho de 2010 (Processo 2009/05211-4) tendo desenvolvido o trabalho intitulado “Avaliação clínica, perfil bioquímico sérico e hemogasometria de bezerros bubalinos experimentalmente infectados por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin”. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, em março de 2011, sob orientação do prof. Dr. José Jurandir Fagliari e coorientação do prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal, como bolsista da FAPESP (Processo 2011/03514-0).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João** e **Neuza**, por todo apoio, incentivo e paciência durante minha vida, e por serem o alicerce para o meu desenvolvimento.

Aos meus irmãos, **André** e **Rodrigo**, pelo convívio que nos torna mais unidos como família.

E a minha noiva **Camila**, pela paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao **prof. Dr. José Jurandir Fagliari**, pela orientação, amizade e confiança.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 2011/03514-0) e auxílio financeiro (Processo: 2011/19480-7).

Ao **prof. Dr. Márcio Ribeiro Garcia**, pela coorientação, colaboração e ensinamentos.

À **Dra. Daniela Gomes da Silva**, pela amizade e ensinamentos, pela dedicação com que me orientou, e por toda a ajuda prestada durante todo o período de realização deste e de outros trabalhos.

Aos pós-graduandos **Virna Clemente** e **André Marcos Santana**, pela ajuda e ensinamentos.

Às graduandas em Medicina Veterinária e bolsistas de Iniciação Científica **Natália Cristina Benincasa** e **Stella Mara Aparecida Morais** pelo auxílio durante a fase experimental.

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP/Câmpus Jaboticabal, **Renata Lemos Nagib Jorge**, **Claúdia Aparecida da Silva Nogueira**, **Marilde Nascimento Matos Bento** e **Paulo César da Silva**, ao funcionário **Fernando José Paganini Listoni**, do [Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública](#) da FMVZ/UNESP/Câmpus Botucatu, e ao pós-graduando **Gustavo Henrique Batista Lara**, da FMVZ/UNESP/Câmpus Botucatu, pelo auxílio no processamento das amostras e análises laboratoriais.

À proprietária **Cristiana Simão Seixas**, que permitiu a utilização dos animais no estudo, e aos funcionários da fazenda **Ailton**, **Eliana**, **Rogério**, **Gorete** e todos aqueles, que ajudaram na colheita das amostras.

Aos meus **colegas de laboratório e de disciplinas**, pela ajuda, compreensão e incentivos.

A **todas as pessoas** que contribuíram de alguma maneira com este projeto.

Aos membros da banca de qualificação (**prof. Dr. José Jurandir Fagliari, Dra. Daniela Gomes da Silva e prof. Dr. Humberto Tonhati**) e defesa (**Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, Dra. Daniela Gomes da Silva e prof. Dr. Luiz Paulo Martins Filho**) por sugerirem alterações valiosas que contribuíram para melhorar a qualidade da dissertação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Propriedade e animais	13
4.2 Colheita das amostras de leite e avaliação dos quartos mamários	15
4.3 Análises laboratoriais	15
4.3.1 Cultivo microbiológico do leite e identificação de micro-organismos	16
4.3.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados (método de difusão com discos)	16
4.3.3 Contagem de células somáticas (CCS)	17
4.3.4 Proteinograma do soro lácteo	17
4.3.4.1 Obtenção das amostras do soro lácteo	17
4.3.4.2 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea	18
4.3.5 Parâmetros bioquímicos da secreção láctea	18
4.4 Avaliação dos índices pluviométricos	19
4.5 Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Teste da caneca de fundo escuro	20
5.2 <i>California Matitis Test</i> (CMT)	21
5.3 Exame microbiológico do leite	22
5.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana	28

5.5 Índices agrometeorológicos	30
	Página
5.6 Influência da pluviosidade no isolamento de micro-organismos do leite de búfalas Murrah	32
5.7 Contagem de células somáticas (CCS)	33
5.8 Perfil bioquímico do soro lácteo	35
5.8.1 Atividade da gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo.....	35
5.8.2 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) no soro lácteo.....	36
5.8.3 Concentração de proteína total (PT) no soro lácteo.....	37
5.8.4 Concentração de albumina (Alb) no soro lácteo.....	39
5.8.5 Concentração de cálcio total (Ca) no soro lácteo.....	40
5.8.6 Concentração de fósforo (P) no soro lácteo.....	41
5.8.7 Concentração de magnésio (Mg) no soro lácteo.....	42
5.8.8 Concentração de cloretos (Cl) no soro lácteo.....	43
5.8.9 Concentração de ferro (Fe) no soro lácteo.....	45
5.8.10 Concentração de cálcio ionizado (Cai) no soro lácteo.....	46
5.8.11 Concentração de sódio (Na) no soro lácteo.....	47
5.8.12 Concentração de potássio (K) no soro lácteo.....	49
5.9 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea	50
5.9.1 Concentração de imunoglobulina A (IgA) no soro lácteo.....	51
5.9.2 Concentração de lactoferrina no soro lácteo.....	52
5.9.3 Concentração de albumina sérica no soro lácteo.....	53
5.9.4 Concentração de imunoglobulina G (IgG) no soro lácteo.....	55
5.9.5 Concentração β -lactoglobulina no soro lácteo.....	56
5.9.6 Concentração α -lactoalbumina no soro lácteo.....	57
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Resultados absolutos e relativos do CMT do leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	22
Tabela 2. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas durante uma lactação completa.....	24
Tabela 3. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas (G1) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	25
Tabela 4. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com duas a três lactações (G2) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	26
Tabela 5. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	27
Tabela 6. Resenha meteorológica da região de São Carlos - SP, no período de 01/05/2011 a 31/11/2012.....	31
Tabela 7. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) no período seco e chuvoso.....	33
Tabela 8. Médias e desvios padrão da CCS (células/mL) no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	34
Tabela 9. Médias e desvios padrão da atividade da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três (G2) lactações e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....	36

- Tabela 10.** Médias e desvios padrão da atividade da enzima fosfatase alcalina (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....37
- Tabela 11.** Médias e desvios padrão da concentração de proteína total (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três (G2) lactações e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....38
- Tabela 12.** Médias e desvios padrão da concentração de albumina (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....40
- Tabela 13.** Médias e desvios padrão da concentração de cálcio total (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....41
- Tabela 14.** Médias e desvio padrão da concentração de fósforo (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....42
- Tabela 15.** Médias e desvios padrão da concentração de magnésio (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....43
- Tabela 16.** Médias e desvios padrão da concentração de cloretos (mEq/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....44
- Tabela 17.** Médias e desvios padrão da concentração de ferro ($\mu\text{g/dL}$) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....46

- Tabela 18.** Médias e desvio padrão da concentração de cálcio ionizado (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....47
- Tabela 19.** Médias e desvios padrão da concentração de sódio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....48
- Tabela 20.** Médias e desvios padrão da concentração de potássio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....49
- Tabela 21.** Médias e desvios padrão da concentração de IgA (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....51
- Tabela 22.** Médias e desvios padrão da concentração de lactoferrina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....53
- Tabela 23.** Médias e desvios padrão da concentração de albumina sérica (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....54
- Tabela 24.** Médias e desvios padrão da concentração de IgG (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....55
- Tabela 25.** Médias e desvios padrão da concentração de β -lactoglobulina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....57

Tabela 26. Médias e desvios padrão da concentração de α -lactoalbumina (mg/dL) no soro lácteo de búfalo Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Búfalas da raça Murrah.....	14
Figura 2. Sala de ordenha tipo tandem.....	14
Figura 3. Amostras de soro lácteo.....	17
Figura 4. Resultado do CMT do leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3).....	22
Figura 5. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas durante uma lactação completa..	24
Figura 6. Frequência de micro-organismos isolados em amostras de leite de búfalas Murrah primíparas (G1) durante uma lactação completa..	25
Figura 7. Frequência de micro-organismos isolados em amostras de leite de búfalas Murrah com duas a três lactações (G2) durante uma lactação completa.....	26
Figura 8. Frequência de micro-organismos isolados em amostras de leite de búfalas Murrah com mais de três lactações (G3) durante uma lactação completa.....	27
Figura 9. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) na fase inicial, intermediária e final da lactação.....	28
Figura 10. Perfil de sensibilidade e de resistência antimicrobiano dos micro-organismos isolados em amostras de leite de búfalas Murrah.....	30
Figura 11. Número de meses classificados como seco e chuvoso no período de maio de 2011 a novembro de 2012.....	32
Figura 12. Número de amostras de leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas com isolamento microbiológico positivo no período seco e chuvoso.....	33
Figura 13. Variação da contagem de células somáticas (CCS) (células/mL) no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três	

- lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....35
- Figura 14.** Variação da atividade da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....36
- Figura 15.** Variação da atividade da enzima fosfatase alcalina no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três (G2) lactações e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....37
- Figura 16.** Variação da concentração de proteína total (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....39
- Figura 17.** Variação da concentração de albumina (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....40
- Figura 18.** Variação da concentração de cálcio total (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....41
- Figura 19.** Variação da concentração de fósforo (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....42
- Figura 20.** Variação da concentração de magnésio (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....44
- Figura 21.** Variação da concentração de cloretos (mEq/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três

- lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....45
- Figura 22.** Variação da concentração de ferro ($\mu\text{g/dL}$) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....46
- Figura 23.** Variação da concentração de cálcio ionizado (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....47
- Figura 24.** Variação da concentração de sódio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....49
- Figura 25.** Variação da concentração de potássio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....50
- Figura 26.** Perfil eletroforético do proteinograma do soro lácteo de búfala Murrah sadia e com isolamento microbiológico negativo.....51
- Figura 27.** Variação da concentração de IgA (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....52
- Figura 28.** Variação da concentração de lactoferrina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....53
- Figura 29.** Variação da concentração de albumina sérica (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....55

- Figura 30.** Variação da concentração de IgG (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....56
- Figura 31.** Variação da concentração de β -lactoglobulina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....57
- Figura 32.** Variação da concentração de α -lactoalbumina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.....59

RESUMO - O presente estudo objetivou realizar o exame microbiológico, a contagem de células somáticas (CCS) e o perfil bioquímico do soro lácteo de amostras de leite de 30 búfalas da raça Murrah, primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) que foram acompanhadas mensalmente durante uma lactação completa (270 dias). Antes da colheita das amostras de leite foi realizado o exame físico da glândula mamária, teste da caneca de fundo escuro e *California Mastitis Test* (CMT). Após a assepsia dos tetos, foram colhidas, amostras de 20 mL de leite de cada quarto mamário, em frascos esterilizados e sem conservante, para o isolamento microbiológico, perfil bioquímico e o fracionamento proteico em SDS-PAGE, e amostras de 30 mL de leite de cada quarto mamário em frascos plásticos esterilizados contendo conservante bronopol para realização da contagem de células somáticas (CCS), em contador automático. Adicionalmente, foi avaliado o perfil da sensibilidade antimicrobiana dos micro-organismos isolados e a influência da pluviosidade sobre a ocorrência de mastite nos animais avaliados. Durante a lactação foi observado aumento da CCS, aumento das atividades das enzimas gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP), aumento das concentrações de proteína total, albumina, fósforo (P), magnésio (Mg), cloretos (Cl), sódio (Na), imunoglobulina A (IgA), lactoferrina, albumina sérica, imunoglobulina G (IgG), α -lactoalbumina e redução das concentrações de cálcio total (Ca), ferro (Fe), cálcio ionizado (Cai), potássio (K) e β -lactoglobulina. As fêmeas primíparas (G1) apresentaram maior atividade das enzimas GGT e ALP e maiores concentrações de P, K e α -lactoalbumina. As fêmeas com duas a três lactações (G2) apresentaram maiores concentrações de proteína total, albumina, Mg, Cl, Fe, Na e lactoferrina. As fêmeas com mais de três lactações (G3) apresentaram maior CCS e maiores concentrações de Ca, Cai, IgA, albumina sérica, IgG e β -lactoglobulina. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* sp. foram os micro-organismos mais isolados nas amostras de leite das búfalas. Não foi verificada influência da pluviosidade na frequência de isolamento de micro-organismos no leite das búfalas ao longo da lactação. Os antibióticos gentamicina, ceftiofur e cefoperazona apresentaram a maior eficiência *in vitro* e neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim apresentaram a menor eficiência *in vitro*. Foi observado multirresistência a três ou mais fármacos em 30,1% dos micro-organismos isolados.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, *California Mastitis Test*, fases da lactação, microbiologia, soro lácteo

BIOCHEMICAL PROFILE, MICROBIOLOGICAL CONDITION AND CELLULARITY OF BUFFALOES MILK

ABSTRACT - The aims of the study were to perform the microbiological examination, somatic cell count (SCC), the biochemical profile, and protein fractionation of milk samples from 30 primiparous Murrah buffaloes (G1), with two or three lactations (G2) and over three lactations (G3). The animals were accompanied monthly during a complete lactation (270 days). Physical examination of the mammary gland, stip cup test, and California Mastitis Test (CMT) were performed for the diagnosis of clinical and subclinical mastitis before sampling. After quarters asepsis, 50 mL of milk samples were collected, each month, from each quarter in sterilized bottles without preservative for the microbiological isolation, biochemical profile, and protein fractionation in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and 30 mL of milk samples from each quarter in plastic bottles sterilized containing bronopol for performing the somatic cell count (SCC) in electronic counter. In addition, were evaluated the antimicrobial sensitivity profile of the microorganisms isolated from milk samples, and the influence of dry or rainy weather on the incidence of mastitis in the animals. During lactation were observed increase in SCC, gammaglutamyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) activities, increase in total protein, albumin, phosphorus (P), magnesium (Mg), chlorides (Cl), sodium (Na), immunoglobulin A (IgA), lactoferrin, serum albumin, immunoglobulin (G), α -lactalbumin concentrations and decrease in total calcium (Ca), iron (Fe), ionized calcium (Cai), potassium (K) and β -lactoglobulin concentrations. The females of G1 showed higher GGT and ALP activity and higher concentration of P, K and α -lactalbumin. The females of G2 showed higher total protein, albumin, Mg, Cl, Fe, Na and lactoferrin concentrations. The females of G3 showed higher SCC, and higher Ca, Cai, IgA, serum albumin, IgG and β -lactoglobulin concentrations. *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus spp.* and *Corynebacterium sp.* were the most frequently isolated microorganisms in milk samples and was not observed influences of the weather in the frequency of isolation of micro-organisms. The antibiotics gentamicin, cefoperazone and ceftiofur demonstrated highest efficiency "in vitro", and noemycin, sulfamethoxazole/trimethoprim demonstrated lowest efficiency in vitro. Multi-resistance to three or more drugs were observed in 30,1% of isolated micro-organism.

Keywords: *Bubalus bubalis*, California Mastitis Test, stage of lactation, microbiology, whey

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de leite de búfala e de seus derivados vem crescendo anualmente, particularmente nos Estados da região Sudeste, devido às características físico-químicas peculiares do leite bubalino (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005).

Os bubalinos, assim como os bovinos, podem apresentar mastite, enfermidade definida como uma reação inflamatória da glândula mamária, causada pela presença de patógenos, traumatismos ou pela ação de substâncias tóxicas, resultando em diminuição da produção leiteira, alterações na concentração dos principais componentes do leite e na elevação da contagem de células somáticas (CCS), que variam de acordo com a intensidade e duração do processo inflamatório (HAMZA; CHOUDHURI, 1994).

As proteínas de fase aguda podem ser utilizadas como método adicional para avaliar o estado de saúde do úbere. Esta técnica se mostrou eficiente na detecção de pequenas quantidades protéicas em fluidos orgânicos, que em decorrência de processos inflamatórios podem ocasionar a destruição do tecido da glândula mamária e aumento da permeabilidade vascular (SANT'ANA, 2004; CECILIANI et al., 2012).

Além disso, outros fatores como a raça, idade, fase da lactação, estação do ano e nutrição também podem interferir na composição do leite bubalino (RENEAU, 1986; HARMON, 1994).

Assim, o presente estudo foi realizado visando avaliar o perfil bioquímico, inclusive proteinograma, com ênfase em proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, a condição microbiológica e a contagem de células somáticas no leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas ao longo de uma lactação completa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie bubalina apresenta todas as características necessárias para uma produção de leite comercial e economicamente viável (CUNHA et al., 2006). A búfala leiteira produz leite de características peculiares, com teores de sólidos que superam consideravelmente os do leite da fêmea bovina. Para indústria de lácteos seu aproveitamento é superior, chegando comparativamente a sobrepujar o rendimento do leite bovino em mais de 40% (TEIXEIRA et al., 2005; ANDRADE et al., 2011).

Segundo dados do IBGE (2012), o número de bubalinos, em 2011, foi de 1,3 milhão de cabeças, um aumento de 7,8% em relação ao ano de 2010. A criação de búfalos concentra-se nas regiões Norte e Sudeste do país, sendo os maiores efetivos registrados no Estado do Pará (38,0%), Amapá (18,4%) e Maranhão (6,5%). O Estado de São Paulo responde pelo sexto maior rebanho do país, com 75,7 mil cabeças (5,9%).

Estima-se que a média de produção anual brasileira seja de 92,3 milhões de litros de leite de búfala, com produção de 18,5 mil toneladas de derivados a partir de 45 milhões de litros de leite (BERNARDES, 2007).

Os bubalinos, assim como os bovinos, podem apresentar mastite. Esta doença é definida como uma reação inflamatória da glândula mamária, podendo ser classificada em infecciosa, traumática ou tóxica (IDF, 1987), manifestando-se nas formas clínica e inaparente ou subclínica (BRAMLEY et al., 1996). A mastite bubalina também representa um problema sério para a produção leiteira, ocasionando prejuízos significativos devido à redução na produção de leite, depreciação dos constituintes do leite, custos com o descarte do leite, gastos com tratamentos e honorários veterinários, perda de tetos, descarte precoce de fêmeas, muitas vezes de alto valor zootécnico, e morte ocasional de animais (HAMZA; CHOUDHURI, 1994).

A mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis na glândula mamária, e presença de grumos, sangue e/ou pus na secreção láctea (FONSECA; SANTOS, 2000). Entretanto, a ocorrência de mastite clínica, em rebanhos bubalinos é baixa. Num estudo com 262 amostras de leite oriundas

de fêmeas bubalinas primíparas e pluríparas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo, Kapronezai, Melville e Benites (2005) obtiveram 99,6% de resultados negativos ao teste da caneca de fundo escuro. Em outro estudo, Pardo (2007), analisando 735 quartos mamários de fêmeas bubalinas da raça Murrah e Jafarabadi, encontrou apenas um caso de mastite clínica (0,14%).

Segundo Lau (1994) as búfalas são menos susceptíveis à mastite que as vacas por apresentarem o *Ductus papilaris* mais musculosos, com maior quantidade de fibras e vasos sanguíneos, funcionando como uma barreira eficiente contra as infecções. Bathia e Valsa (1994) afirmam ainda que outro fator importante para a menor susceptibilidade das búfalas à mastite é a presença de grandes quantidades de lactoferrina no leite, uma substância antibacteriana que compete com as bactérias pelo ferro, tornando-o indisponível e impedindo o crescimento bacteriano.

A mastite inaparente ou subclínica não induz alterações visíveis no úbere ou nas características do leite (BRAMLEY et al., 1996). No entanto, causa alterações na concentração dos principais componentes do leite, decorrentes de lesões no tecido mamário. As infecções mamárias resultam em diminuição dos teores de lactose, proteína e gordura, além de aumento da permeabilidade vascular, permitindo a passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas (STEFFERT, 1993).

A mastite subclínica tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros, pois sua prevalência é maior do que a da forma clínica (PHILPOT; NICKERSON, 1991) assim medidas para o seu controle tem recebido grande atenção. Além disso, a presença de micro-organismos no leite e consequentemente em seus derivados pode ocasionar a transmissão de doenças (BADINI, 1995; COSTA et al., 1995). Os dois métodos internacionalmente aceitos para o diagnóstico da mastite subclínica são o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) (CARDOZO, 1996).

Nas últimas décadas, os micro-organismos comumente envolvidos na gênese da mastite em animais de produção foram agrupados em contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*) e

ambientais (*Streptococcus* spp., enterobactérias, fungos, algas e actinomicetos) (RADOSTITS et al., 2007). Os micro-organismos contagiosos, também considerados dependentes da vaca, são transmitidos no momento da ordenha, pelo equipamento de ordenha, pela mão do ordenhador e pela microbiota bucal dos bezerros e, geralmente, estão relacionados à mastite subclínica. Por outro lado, os micro-organismos ambientais são transmitidos principalmente no período entre as ordenhas e estão associados à contaminação da glândula mamária a partir do solo, água e cama dos animais, causando principalmente mastite clínica (RIBEIRO, 2008).

À semelhança das vacas, as bactérias mais frequentemente isoladas em casos de mastite em búfalas também são representadas pelos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PRASAD; RATHMAN; SHAH, 1996). Ali et al. (2008) observaram que estes dois gêneros representaram 73,6% dos isolamentos obtidos de rebanhos bubalinos no Paquistão.

No entanto, o hábito da espécie bubalina de adentrar terrenos alagadiços pode favorecer a infecção mamária por micro-organismos ambientais, particularmente fungos, enterobactérias e algas (RIBEIRO, 2008; OSMAN et al., 2009).

O CMT, idealizado por Schalm e Noorlander (1957), um dos testes mais comumente utilizado no diagnóstico da mastite subclínica, é considerado indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. O teste consiste na colheita de leite em raquete própria, contendo receptáculos circulares individuais para cada quarto mamário, ao qual se adiciona um detergente aniônico neutro, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA) que, em contato com o DNA celular, confere viscosidade à mistura. De acordo com a viscosidade da solução a intensidade da reação é classificada em negativa (-), leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA; SANTOS, 2000).

O termo células somáticas do leite é utilizado para designar todas as células presentes na secreção láctea. São representadas principalmente pelos leucócitos (particularmente neutrófilos) e células epiteliais provenientes da descamação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna do

teto, as quais são eliminadas fisiologicamente no leite durante o curso normal da lactação (GALIERO; MORENA, 2000).

A inflamação da glândula mamária resultante da introdução e multiplicação de micro-organismos patogênicos induz uma série complexa de eventos que reduz a atividade de síntese da glândula, provoca mudanças na composição do leite e eleva a contagem de células somáticas (CCS). A CCS pode ser considerada uma expressão direta da severidade da inflamação. Este parâmetro é utilizado atualmente para avaliar a saúde do úbere, quanto à qualidade e higiene do leite, e o monitoramento em programas de controle de mastite, bem como para o pagamento por qualidade do produto (BRASIL, 2002). Assim, o principal fator que influencia o aumento das células somáticas no leite é o estado infeccioso (HARMON, 1994). No entanto, outras variáveis como estado e duração da lactação, idade do animal, nutrição, raça e estações do ano podem influenciar a CCS (RENEAU, 1986; HARMON, 1994).

No início da lactação, observa-se um acréscimo no valor da CCS devido à presença de imunoglobulinas e, conseqüentemente, de células de defesa (VOLTOLINI et al., 2001). No final da lactação também se verifica um acréscimo na CCS, devido a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária (HARMON; RENEAU, 1993; MONARDES, 1994).

No Brasil, ainda não existe uma legislação que regulamente o padrão de CCS para búfalas e o uso de parâmetros utilizados para bovinos de CCS tem-se mostrado inadequado, pois os valores das contagens são significativamente menores em bubalinos do que nos bovinos (AMARAL, 2005; ARAÚJO; GHELLER, 2005). Carvalho et al. (2007) e Medeiros et al. (2011) observaram que valores baixos de CCS não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária. Estes mesmos autores também verificaram altos valores de CCS em amostras de leite com isolamento microbiológico negativo.

Zafalon et al. (2010) investigaram a influência das estações do ano (período “seco” e “chuvoso”) e o número de lactações na celularidade de vacas e não identificaram influência dos índices pluviométricos nos valores da CCS, mas observaram uma tendência de maior contagem de células somáticas em animais com mais de cinco lactações. No entanto, não foram encontrados na literatura nacional estudos voltados à avaliação dos índices pluviométricos em

búfalos, tampouco do perfil de celularidade do leite das búfalas durante uma lactação completa. Os estudos de acompanhamento de búfalas geralmente estão restritos à avaliação pontual da celularidade em animais com e sem mastite (COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1997; CERÓN-MUÑOZ; TONHATI; DUARTE, 2002; CERÓN-MUÑOZ et al., 2002; AMARAL et al., 2004).

Alguns estudos mostraram que a CCS no leite de búfalas apresenta valores crescentes da primeira lactação para as lactações seguintes (CERÓN-MUÑOZ; TONHATI; DUARTE, 2002; CERÓN-MUÑOZ et al., 2002), porém não demonstraram se estas diferenças foram significativas. Em bovinos, os animais mais velhos tendem a ter maior CCS do que animais mais jovens; há evidências de que a relação entre idade e incremento da CCS é de origem microbiológica, ou seja, há uma relação positiva entre a ordem de lactação e a ocorrência de mastite (AMARAL, 2005). O que ocorre é que os animais mais velhos têm maiores chances de exporem-se aos patógenos causadores de mastite, resultando em aumento gradual do número de quartos infectados, além de terem infecções mais longas, o que causa lesões mais extensas nos tecidos da glândula mamária (RENEAU, 1986; O'ROURKE; BLOWEY, 1992). Por outro lado, Singh e Ludri (2001) e Amaral (2005) não observaram alterações significativas entre CCS no leite de búfalas e a ordem de parto, provavelmente por tratar-se de animais sadios e com baixa CCS. Bastos e Birgel (2011) também não verificaram diferenças na CCS de animais sadios ao longo das fases da lactação.

A invasão da glândula mamária por micro-organismos é seguida de aumento do número de leucócitos no leite, notadamente por neutrófilos (BURVENICH; GUIDRY; PAAPE, 1995), que migram do sangue para a glândula mamária. Na glândula infectada as células de defesa podem corresponder até 99% das células encontradas no leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Desse modo, o uso da CCS do leite pode indicar, quantitativamente, o grau de infecção da glândula mamária (MACHADO; PEREIRA; SARRIES, 2000), expressando a gravidade da inflamação. Búfalas com elevada CCS apresentam menor produção de leite (PETROVA; TZANKOVA, 1999; CERÓN-MUÑOZ et al., 2002; TRIPALDI et al., 2003), alterações nos teores dos constituintes do leite (PETROVA; TZANKOVA, 1999;

TRIPALDI et al., 2003) e alterações no tempo de coagulação do leite no processo de fabricação de queijos, comprometendo a qualidade, o processamento e o rendimento industrial (SINGH; SINGH, 1981; TRIPALDI et al., 2003). Não há evidência de que o aumento da CCS tenha efeito direto na saúde humana. Entretanto, a presença de alta contagem de células no leite pressupõe risco de consumo do leite cru ou sem tratamento térmico adequado à destruição de patógenos, bem como a presença de resíduos antimicrobianos, que podem causar gastroenterite e hipersensibilidade em humanos (SMITH, 2002; RIBEIRO, 2008).

Em vacas, considera-se normal para o leite proveniente de quartos mamários não infectados ou sem inflamação as contagens inferiores a 100.000 células/mL. CCS entre 100.000 e 199.999 células/mL representa contagem intermediária entre a normalidade e a infecção, enquanto valores acima de 200.000 células/mL são indicativos de infecção (SMITH, 2002). De acordo com a Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a CCS aceitável para o leite bovino de conjunto é <600.000 células/mL (BRASIL, 2011). No entanto, não há padrão claro de qualidade para o leite de búfalas no país. No Brasil, Cerón-Muñoz, Tonhati e Duarte (2002), ao analisarem 5.931 amostras referentes à CCS do leite de búfalas em lactação de diferentes rebanhos do Estado de São Paulo, verificaram que 89% das amostras analisadas apresentaram CCS inferior a 140.000 células/mL. Destas, 38% apresentavam CCS de até 17.000 células/mL, com média de 79.000 células/mL. Em outro estudo, Cerón-Muñoz et al. (2002b), analisando 2.693 amostras de leite de búfalas de um rebanho, verificaram que 80% delas apresentavam CCS abaixo de 70.000 células/mL e apenas 3,2% das amostras excederam 282.000 células/mL, com média de 63.000 células/mL. Em Minas Gerais, Amaral et al. (2004) ao estudarem a CCS em 1.293 amostras individuais de leite de 283 búfalas e 164 amostras de leite total de búfalas de 19 rebanhos bubalinos, encontraram médias de CCS de 24.000 células/mL e 22.000 células/mL, respectivamente.

Carvalho et al. (2007) isolaram diversos patógenos em amostras de leite bubalino com CCS variando entre 12.840 células/mL a 149.680 células/mL. No mesmo estudo foi demonstrada a presença de infecção mista (agentes

contagiosos e ambientais) e de patógenos classificados como ambientais nas amostras que apresentaram os maiores valores de CCS. Kapronezai (2004), em estudo com leite bubalino, relatou valores de mediana para CCS de 8.500 células/mL, 10.350 células/mL, 9.600 células/mL, quando foram isolados *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* sp., respectivamente. O mesmo autor observou que a frequência de quartos negativos ao CMT e com isolamento microbiológico foi maior do que a frequência de quartos positivos e com isolamento de micro-organismos, indicando que há elevada frequência de portadores, ou que o teste de CMT não é eficiente na triagem da mastite subclínica em búfalas.

Em um estudo realizado no Vale do Ribeira, Costa et al. (1997b) revelaram prevalência de mastite subclínica em 14,5% dos 1.252 quartos de búfalas primíparas ou pluríparas. A avaliação microbiológica das amostras de leite evidenciou 23,7% de infecção, com isolamento de *Corynebacterium* sp. (59,2%) e *Staphylococcus* spp. (principalmente coagulase positiva) (17,6%), *Streptococcus agalactiae* (13,0%), *Enterobacteriaceae* (2,80%) e *Micrococcus* spp. (0,90%). Avaliando 454 amostras de leite bubalino, Costa et al. (1999) encontraram 170 (37,4%) quartos com resultados positivos ao exame microbiológico. Nestes, os estafilococos também predominaram com 45,3% dos isolamentos, seguidos por *Corynebacterium* sp. (27,6%) e *Streptococcus* spp. (1,76%); e infecções mistas (25,3%). Em estudo similar, Costa et al. (2000) avaliaram 778 búfalas em lactação e encontraram 0,44% de prevalência de mastite clínica e 7,15% de mastite subclínica. Notaram que nos casos de mastite clínica foram isolados com maior frequência *Corynebacterium* sp. (37,5%), *S. uberis* (25,0%) e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva (25,0%), enquanto que nos casos de mastite subclínica foram identificados principalmente *Staphylococcus* spp. (20,9%), *Corynebacterium* sp. (19,7%) e *Streptococcus* spp. (16,9%).

O método mais fidedigno de rotina para se avaliar a condição microbiológica da glândula mamária é a realização de cultura de todos os quartos mamários das vacas lactantes (BRITO et al., 1999). Isto permite a identificação dos micro-organismos e do grau de infecção no rebanho. Apresenta como limitações o custo e a necessidade de amostragem individual

por quarto. Uma alternativa para a redução dos custos é a cultura de amostras compostas de todos os quartos do mesmo animal. Nesse caso, deve-se ter o cuidado de obter quantidades aproximadamente iguais de leite de cada glândula, porque o número de glândulas infectadas por vaca influencia a sensibilidade da cultura. Amostras compostas de todos os quartos do animal tiveram alta sensibilidade para o isolamento de *S. agalactiae* (DINSMORE et al., 1991), mas menor sensibilidade para detecção de *S. aureus* (LAM et al., 1996). A sensibilidade relativa para o isolamento de *S. aureus* de amostras compostas de vacas com apenas uma glândula infectada foi de 58%. Quando as quatro glândulas estavam infectadas foi de 89% (LAM et al., 1996).

Larson (1979) verificou que as proteínas do leite podem originar-se de diferentes formas, sendo a maioria das proteínas específicas da lactação e outras, em menor quantidade, são as do sangue, em parte derivadas de outros tipos de células e seus produtos. As frações albumina plasmática e gamaglobulina, e uma pequena porção de caseína seriam pré-formadas no sangue para, posteriormente, serem incorporadas ao leite. Ao passo que outras proteínas lácteas, como as frações caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, seriam exclusivamente sintetizadas na glândula mamária durante a galactopoiese, por células altamente diferenciadas (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971; LARSON, 1979).

Vários pesquisadores recomendam a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para detecção de proteínas, mesmo aquelas que ocorrem em pequenas concentrações no soro sanguíneo (FAGLIARI; SILVA, 2002; SILVA, 2007; ROCHA, 2010; SANTANA, 2012) ou no leite (HILLIER, 1976; KATO; MORI; KATOH, 1989; PUHAN; URECH; SCHALLIBAUM, 1999; LITWINCZUK et al., 2011; CECILIANI et al., 2012).

Em decorrência dos processos inflamatórios na glândula mamária ocorrem alterações tanto na concentração dos componentes protéicos do leite como também surgimento de compostos protéicos não elaborados no processo de secreção láctea. Estas alterações normalmente são caracterizadas pela diminuição das concentrações das proteínas sintetizadas no parênquima da glândula mamária, devido à destruição do tecido, e aumento das proteínas de

origem sanguínea, devido ao aumento da permeabilidade capilar (SANT'ANA, 2004; CECILIANI et al., 2012). Neste contexto, o proteinograma do leite tem sido utilizado como ferramenta adicional para a avaliação da glândula mamária, uma vez que os processos inflamatórios podem estimular a produção, tanto no soro sanguíneo quanto no soro lácteo, de proteínas de fase aguda (MARTINS FILHO, 2006; COSTA et al., 2010; CECILIANI et al., 2012).

Sant'Ana (2004), estudando o fracionamento eletroforético de vacas das raças Jersey e Gir em lactação, constatou efeito significativo de fatores raciais na concentração de proteínas totais do soro lácteo e das frações imunoglobulínica, α_1 -antitripsina, β -lactoglobulina e outras proteínas do soro lácteo de vacas sadias em lactação. Observou, ainda, influência significativa da mastite no proteinograma do leite de vacas, principalmente das proteínas não sintetizadas no ciclo fisiológico de secreção da glândula mamária. Sant'ana et al. (2006), em pesquisa com vacas lactantes adultas, observaram que uma retenção láctea de 10% (fator predisponente para desenvolvimento de mastite) determinou aumento significativo das frações protéicas não sintetizadas na glândula mamária (albumina e imunoglobulinas séricas, lactoferrina, α_1 -antitripsina) durante o período de retenção, caracterizando a inflamação.

Litwunczuk et al. (2011), estudando as frações protéicas de amostras de leite bovino obtidas durante três anos de acompanhamento verificaram que os animais que apresentaram elevação da CCS apresentaram decréscimo das concentrações de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina e uma elevação das concentrações das proteínas lactoferrina e lisozima, bem como da albumina de origem plasmática.

O tratamento da mastite em animais visa eliminar os agentes causais, os riscos de novas infecções, a mortalidade das fêmeas e de seus neonatos, além de prevenir infecções no período seco. A regressão da inflamação permite o restabelecimento funcional da glândula mamária e a conseqüente normalização da constituição físico-química, da celularidade e da produção do leite. O uso racional dos antimicrobianos na terapia de animais de produção melhora os índices de cura e reduz o teor de resíduos de antibióticos e quimioterápicos no leite. Por outro lado, o uso indevido de antimastíticos reflete em baixa efetividade da terapia, no aumento da pressão seletiva para linhagens

resistentes, em prejuízo na produção de derivados lácteos, bem como em riscos de reações orgânicas adversas em humanos (RIBEIRO, 2008). No entanto, são escassos os estudos nacionais que contemplem a avaliação do perfil de sensibilidade dos micro-organismos isolados de casos de mastite em búfalas, tampouco voltados à investigação de linhagens multirresistentes aos antimicrobianos.

Tendo em vista o aumento da criação de bubalinos no Estado de São Paulo, o número escasso de estudos relacionados à celularidade e ao proteinograma do leite de búfalas, bem como a influência das estações do ano, a ordem de lactação e o número de partições na CCS e na composição do leite, propôs-se a realização desse trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Determinar o perfil bioquímico, inclusive proteinograma, com ênfase em proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, condição microbiológica e contagem de células somáticas do leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar a celularidade e o perfil bioquímico do soro lácteo, inclusive proteinograma obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, de búfalas Murrah primíparas e pluríparas sadias ao longo de uma lactação completa.

3.2.2 Avaliar a presença e o perfil de sensibilidade microbiana dos micro-organismos isolados nas amostras de leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas ao longo de uma lactação completa.

3.2.3 Avaliar o efeito do índice pluviométrico na ocorrência de mastite em búfalas Murrah primíparas e pluríparas ao longo de uma lactação completa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Propriedade e animais

Durante o período de maio de 2011 a novembro de 2012 foram acompanhadas, mensalmente, durante uma lactação completa (270 dias), 30 búfalas escolhidas aleatoriamente, pertencentes a uma propriedade rural localizada no município de Analândia, no Estado de São Paulo, situada à latitude 22°07'33" sul, longitude 47°39'46" oeste e altitude de 675 metros.

O rebanho era constituído por, aproximadamente, 300 animais da raça Murrah, mantidos em regime extensivo de criação (Figura 1) e suplementados com polpa cítrica. O programa sanitário adotado na propriedade incluía a vacinação contra febre aftosa e brucelose, exames semestrais de tuberculose e desvermifugação semestral dos animais, com rotação de princípio ativo. Cerca de 100 búfalas encontravam-se no período de lactação e eram, ordenhadas uma vez ao dia pela manhã. A produção diária média era de 6 kg de leite por animal. A ordenha era realizada em sala tipo tandem (Figura 2), utilizando-se ordenhadeira mecânica, com bezerro ao pé. Antes da ordenha era realizado o pré-dipping com solução de cloro e secagem dos tetos com papel toalha. Terminada a ordenha a búfala era liberada junto com o bezerro para a área externa.

Os animais foram distribuídos de acordo com o número de lactação, em três grupos:

- Grupo 1 (G1): 10 animais de primeira lactação,
- Grupo 2 (G2): 10 animais com duas ou três lactações,
- Grupo 3 (G3): 10 animais com mais de três lactações.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 017093/12).



Figura 1. Búfalas da raça Murrah.

Figura 2. Sala de ordenha tipo tandem.

4.2 Colheita das amostras de leite e avaliação dos quartos mamários

Durante o estudo, todos os quartos mamários analisados foram submetidos aos exames de inspeção e palpação (RADOTISTIS et al., 2007). Após a estimulação da descida do leite pelo bezerro foi realizada a prova da caneca telada de fundo escuro e o *California Mastitis Test* – CMT (SCHALM; NOORLANDER, 1957).

Os resultados do CMT foram classificados de acordo com a intensidade da reação (viscosidade da solução) em: negativo (-), de intensidade leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

As amostras de leite colhidas mensalmente durante o período completo de lactação (270 dias) foram distribuídas em três momentos denominados: fase inicial (primeiro ao terceiro mês de lactação), fase intermediária (quarto ao sexto mês de lactação) e fase final da lactação (sétimo ao nono mês de lactação).

Antes da colheita das amostras de leite foi realizada assepsia dos quartos mamários com algodão embebido em álcool 70%.

Para a realização do isolamento microbiológico, obtenção do perfil bioquímico e do fracionamento das proteínas do soro lácteo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram colhidas, por meio de ordenha manual, amostras de 20 mL de leite de cada quarto mamário, em frascos de plásticos estéreis sem conservante. Após a colheita, todas as amostras foram acondicionadas e transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o laboratório. Para a contagem de células somáticas (CCS) foram colhidas amostras de 30 mL de leite de cada quarto mamário, em frascos plásticos estéreis contendo bronopol como conservante.

4.3 Análises laboratoriais

O exame microbiológico das amostras de leite das búfalas e o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Mastites do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Câmpus de Botucatu-SP.

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Lactação “Lair Antônio de Souza” (LAFLA), da Clínica do Leite, no

Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP/Piracicaba-SP.

O fracionamento das proteínas do soro lácteo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as análises bioquímicas do soro lácteo foram realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV- UNESP/Câmpus de Jaboticabal-SP.

4.3.1 Cultivo microbiológico do leite e identificação de micro-organismos

Uma alíquota de 10 uL de cada amostra de leite colhido de forma asséptica de cada quarto mamário, com e sem mastite, visando o cultivo microbiano e a identificação qualitativa dos micro-organismos, foi semeada em ágar sangue ovino desfibrinado 5% e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose, com leituras diárias durante 72 horas. Simultaneamente, todas as amostras de leite foram cultivadas no meio Sabouraud dextrose, mantidas a 37°C, visando o isolamento e identificação de micro-organismos fúngicos (QUINN et al., 2005). Os micro-organismos foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (QUINN; CARTER; MARKEY, 1994; QUINN et al., 2005; TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005; TRABULSI; ORDONEZ; MARTINEZ, 2005; MURRAY et al., 2007).

4.3.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados (método de difusão com discos)

As linhagens dos micro-organismos isoladas foram submetidas à prova de sensibilidade antimicrobiana pelo método de difusão com discos (CLSI, 2005; CLSI, 2006). Foram utilizados princípios ativos de antimicrobianos disponíveis comercialmente e amplamente utilizados na terapia da mastite, a saber: ampicilina (10 µg), cefoperazona (75 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), oxacilina (5 µg), penicilina (10 UI) e sulfametoxazole/trimetoprim (25 µg). A ocorrência de linhagens multirresistentes foi considerada quando houve resistência múltipla (simultânea) para três ou mais dos fármacos.

4.3.3 Contagem de células somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas foi realizada pelo método de citometria de fluxo em contador automático¹.

4.3.4 Proteinograma do soro lácteo

4.3.4.1 Obtenção das amostras do soro lácteo

O soro lácteo (Figura 3) foi obtido coagulando-se as amostras de leite pela adição de 5% de solução de renina² utilizando técnica sugerida por Santana e Birgel (2003). O soro lácteo separado, após a coagulação, foi congelado à temperatura de -20°C até o momento dos exames laboratoriais.

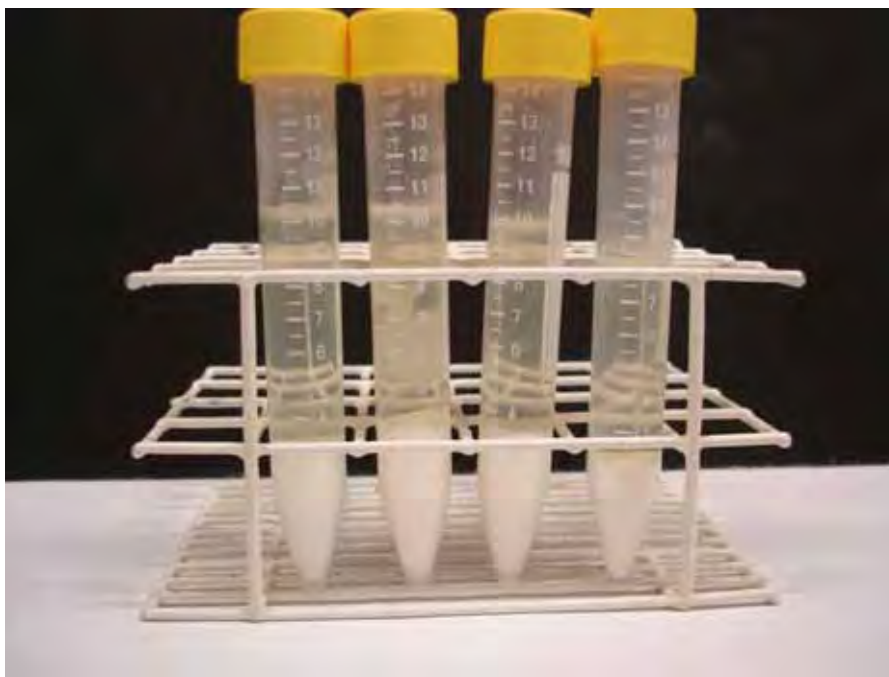


Figura 3. Amostras de soro lácteo.

4.3.4.2 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea

A concentração de proteína total do soro lácteo foi determinada pela técnica do biureto, utilizando-se conjunto de reagentes comerciais³. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático⁴.

¹ Somacount 300, Bentley Instruments Incorporated, Minnesota, EUA

² Coelho Estrella, Chr. Hansen Brasil Ind. e Com. Ltda, Valinhos, São Paulo, Brasil

³ Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil

⁴ Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil

O fracionamento protéico foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos com Coomassie Brillhante Blue R a 0,25% e, posteriormente, descorado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até as frações protéicas se apresentem nítidas. As concentrações das proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado⁵. Como referência foi utilizada uma solução marcadora⁶ com diferentes pesos moleculares, além das proteínas purificadas IgG, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, α_1 -antitripsina e lactoglobulina de origem bovina.

4.3.5 Parâmetros bioquímicos da secreção láctea

Nas amostras do soro lácteo foram determinadas as atividades das enzimas gamaglutamiltransferase (método de Szasz modificado) e fosfatase alcalina (método de Bowers e McComb modificado), bem como as concentrações de proteína total (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol), cálcio total (método de CPC), fósforo (método de Daly e Ertinghausen modificado), magnésio (método Labtest), cloro (método Labtest), e ferro (método de Goodwin modificado), utilizando-se conjunto de reagentes comerciais³. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático⁴, com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Adicionalmente foram determinados os teores de cálcio ionizado, sódio e potássio, pelo método seletivo de íons em analisador automático⁷.

Quando necessário, foram realizadas diluições das amostras de soro lácteo em água destilada ou solução fisiológica, de acordo com as recomendações do fabricante dos reagentes comerciais e dos equipamentos utilizados para as análises bioquímicas.

4.4 Avaliação dos índices pluviométricos

⁵ Shimadzu CS9301, Tóquio, Japão

⁶ Sigma, St Louis, MO, EUA

⁷ 9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha

O índice pluviométrico mensal da região de São Carlos - SP foi obtido junto ao Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e classificado em período “seco” (pluviosidade média ao redor 30 mm e máxima ≤ 60 mm) e “chuvoso” (pluviosidade média ao redor de 120 mm e mínima ≥ 70 mm), adaptado de Zafalon et al. (2010).

4.5 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre pares de médias, com auxílio do programa estatístico computadorizado Statistical Analysis System (SAS – Versão 9.1).

Para as variáveis albumina, ferro e imunoglobulina A, empregou-se a análise de variância não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparação entre pares de médias, com auxílio do programa estatístico computadorizado GrafPad Prism (Versão 3.0).

Para testar a influência do clima seco ou chuvoso sobre a ocorrência de mastite nas búfalas foi utilizado o teste do qui-quadrado (TRIOLA, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental foram colhidas 1042 amostras de leite, sendo 344 amostras de fêmeas bubalinas Murrah primíparas (G1), 352 amostras de fêmeas com duas a três lactações (G2) e 346 amostras de fêmeas com mais de três lactações (G3) ao longo de uma lactação completa.

Para a avaliação da influência da ordem de parto e da fase da lactação sobre a contagem de células somáticas, perfil bioquímico e proteinograma do leite de búfalas foram utilizadas apenas as amostras de leite com isolamento microbiológico negativo totalizando 923 amostras avaliadas.

5.1 Teste da caneca de fundo escuro

No teste de caneca de fundo escuro não foi constatada qualquer alteração nas características físicas do leite, das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) ao longo da lactação.

Estes dados são semelhantes aos obtidos por Kapronezai, Melville e Benites (2005) que observaram apenas 1 (0,44%) resultado positivo no teste da caneca de fundo escuro entre 261 amostras de leite de fêmeas bubalinas examinadas. Pardo (2007), analisando 735 quartos mamários de fêmeas bubalinas da raça Murrah e Jafarabadi, também encontrou apenas um caso de mastite clínica (0,14%). No Paquistão, Ali (2009) encontrou 14,4% de prevalência de mastite clínica em rebanhos bubalinos e 20% na espécie bovina. Como a maioria dos micro-organismos causadores da mastite adentram na glândula mamária pelo óstio do teto e devido ao fato das búfalas apresentarem tetos longos e musculatura lisa mais forte, o acesso dos patógenos à glândula mamária nesta espécie é dificultado (ALI, 2009). Um outro fator que pode contribuir para esta baixa ocorrência de mastite clínica é o presença de grandes quantidades de lactoferrina no leite bubalino, uma substância antibacteriana que compete com as bactérias pelo ferro (BATHIA; VALSA, 1994).

5.2 California Matitis Test (CMT)

Das 1042 amostras de leite obtidas das fêmeas dos três grupos experimentais, 87 (8,34%) apresentaram reações positivas no CMT e 955 (91,6%) mostraram-se negativas (Tabela 1 e Figura 4).

Estes resultados são superiores dos obtidos por Kapronezai, Melville e Benites (2005), que verificaram 3,80% de reações positivas em amostras de leite bubalino, e inferiores aos obtidos por JORGE et al. (2005) e CUNHA et al. (2006), que encontraram frequência de 17,6% e 20,1%, respectivamente. Ali (2009) observou 14,4% de reações positivas em rebanhos bubalinos no Paquistão. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferentes condições de manejo das propriedades estudadas.

Dentre os 87 resultados positivos ao CMT, 28 amostras (32,2%) apresentaram reação leve, 22 amostras (25,3%) apresentaram reação moderada e 37 amostras (42,5%) apresentaram reação intensa (Tabela 1).

Das 344 amostras colhidas de fêmeas primíparas (G1), 6 (1,74%) apresentaram reação de intensidade leve ao CMT e 1 (0,29%) apresentou reação de intensidade moderada. Das 352 amostras de leite colhidas das fêmeas com duas a três lactações (G2), 28 (7,95%) apresentaram reação positiva ao CMT, sendo que 13 amostras (46,4%) apresentaram reação leve, 5 amostras (17,8%) apresentaram reação moderada e 10 amostras (35,7%) apresentaram reação intensa (Tabela 1).

Ocorreram reações positivas ao CMT em 52 amostras (15,0%) das 346 amostras analisadas de fêmeas bubalinas com mais de três lactações (G3). Destas 9 amostras (17,3%) apresentaram reação leve, 16 amostras (30,7%) apresentaram reação moderada e 27 amostras (51,9%) apresentaram reação intensa (Tabela 1).

As fêmeas bubalinas mais velhas apresentaram maior número de reações positivas ao CMT (Tabela 1) quando comparadas com as fêmeas mais novas. As búfalas do G3 apresentaram o maior número de reações positivas ao CMT na fase inicial, intermediária e final da lactação (Tabela 1). Estes resultados podem estar relacionados à maior manipulação da glândula mamária e o maior número de lactações no evoluir da idade que contribuem

para a instalação de processo inflamatório de origem infecciosa (BASTOS; BIRGEL, 2011).

Tabela 1. Resultados absolutos e relativos do CMT do leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	CMT	Fases da lactação			Total
		Inicial	Intermediária	Final	
G1	-	128 (98,5%)	124 (99,2%)	85 (95,5%)	337 (98,0%)
	+	1 (0,77%)	1 (0,80%)	4 (4,49%)	6 (1,74%)
	++	1 (0,77)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,29%)
	+++	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00%)
Total		130 (100%)	125 (100%)	89 (100%)	344 (100%)
G2	-	118 (98,3%)	122 (92,4%)	84 (84,0%)	324 (92,0%)
	+	1 (0,83%)	6 (4,54%)	6 (6,00%)	13 (3,69%)
	++	0 (0,00)	1 (0,75%)	4 (4,00%)	5 (1,42%)
	+++	1 (0,83%)	3 (2,27%)	6 (6,00%)	10 (2,84%)
Total		120 (100%)	132 (100%)	100 (100%)	352 (100%)
G3	-	69 (85,4%)	119 (86,2%)	106 (83,3%)	294 (85,5%)
	+	3 (3,66%)	5 (3,62%)	1 (0,79%)	9 (2,62%)
	++	5 (6,10%)	6 (4,35%)	5(3,94%)	16 (4,65%)
	+++	4 (4,88%)	8 (5,80%)	15 (11,8%)	27 (7,85%)
Total		82 (100%)	138 (100%)	127 (100%)	346 (100%)

- : reação negativa; + : reação leve; ++ : reação moderada;+++ : reação intensa

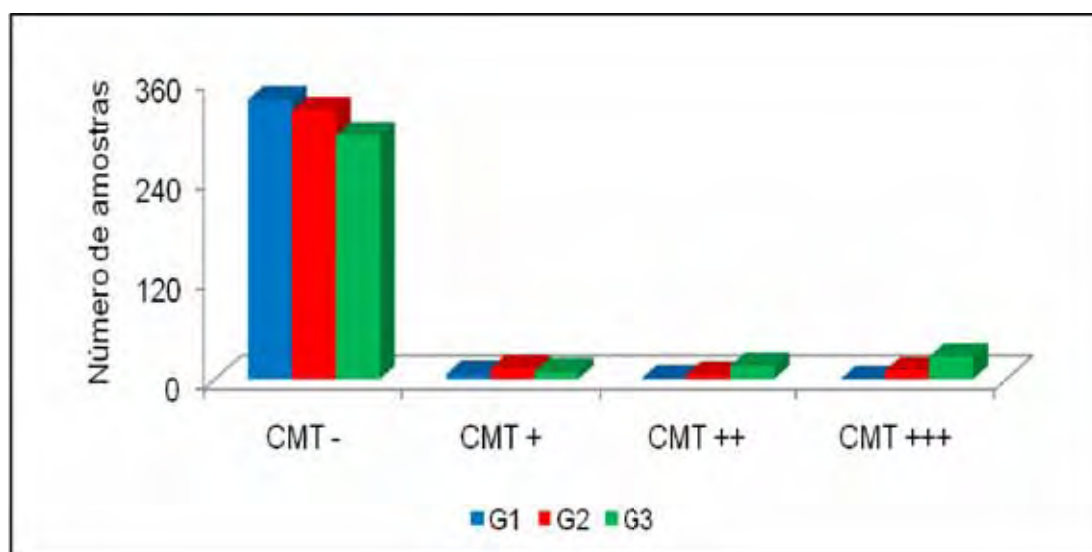


Figura 4. Resultado do CMT do leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3).

5.3 Exame microbiológico do leite

Das 1042 amostras de leite colhidas das búfalas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) submetidas ao exame microbiológico, 119 amostras (11,4%) apresentaram crescimento bacteriano. Não foi observado crescimento de leveduras e/ou fungos nas amostras de leite bubalino analisadas (Tabela 2

e Figura 5). Estes resultados são bem inferiores aos descritos por Cunha et al. (2006), Pardo (2007) e Kapronezai, Melville e Benites (2005), os quais isolaram micro-organismos em 78,6%, 60,5% e 24,4% das amostras de leite bubalino, respectivamente.

Os micro-organismos mais isolados foram: *Streptococcus* spp. (43,6%), *Staphylococcus* spp. (21,0%), *Corynebacterium* sp. (23,5%), *Bacillus* spp. (7,56%), *Klebsiella pneumoniae* (0,84%) e *Pasteurella multocida* (0,84%) (Tabela 3 e Figura 6). Foram observadas infecções mistas em 2,52% dos isolamentos.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Medeiros et al. (2011), que observaram uma frequência de isolamento de 21,8% para *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphylococcus* spp.), 1,3% para *Staphylococcus aureus* e 16,7% para *Corynebacterium* sp. em amostras de leite de búfala, e aos encontrados por Ali (2009), que observou 23,8% de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite bubalino. Entretanto, Ali (2009) verificou menor número de isolamentos de *Bacillus* spp. (3,74%) e de *Streptococcus dysgalactiae* (0,93%).

A presença de casos de mastite subclínica no rebanho bubalino, além de causar prejuízos econômicos ao produtor e constituir uma fonte de infecção para outros animais da propriedade, pode constituir também um problema de saúde pública, devido à possibilidade da transmissão dos patógenos causadores de mastite e de suas toxinas por meio do consumo do leite e produtos lácteos contaminados, acarretando riscos à saúde do consumidor (MARTINS et al., 2010).

Tabela 2. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas durante uma lactação completa.

Micro-organismos	Número (%)
<i>Bacillus</i> spp.	9 (7,56%)
<i>Corynebacterium</i> sp.	28 (23,5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (0,84%)
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	24 (20,2%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	26 (21,8%)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7 (5,88%)
<i>Streptococcus</i> spp.	16 (13,4%)
<i>Streptococcus</i> α -hemolítico	1 (0,84%)
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	2 (1,68%)
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Staphylococcus</i> β -hemolítico	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> β -hemolítico + <i>Streptococcus</i> α -hemolítico	1 (0,84%)
Total	119 (100%)

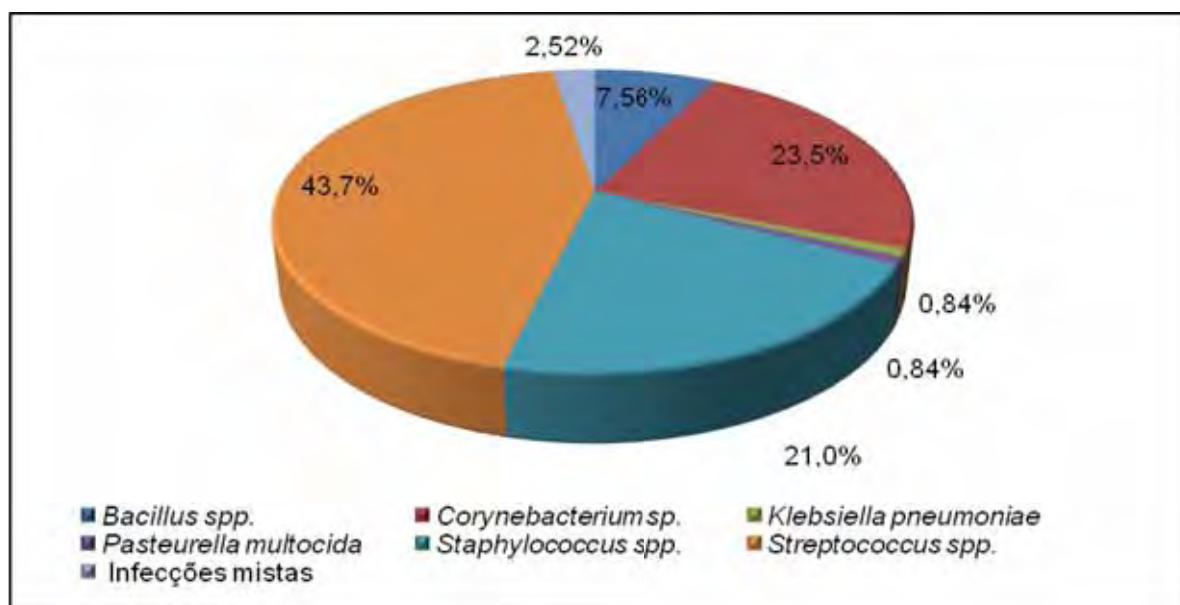


Figura 5. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas durante uma lactação completa.

Das 344 amostras de leite colhidas das fêmeas primíparas (G1) houve crescimento bacteriano em 40 amostras (Tabela 3 e Figura 6). Os micro-organismos isolados com maior frequência durante a fase inicial da lactação foram *Staphylococcus* spp. (47,6%) e *Bacillus* spp. (38,0%). Na fase intermediária da lactação foram isolados com maior frequência *Staphylococcus* spp. (37,5%) e *Streptococcus agalactiae* (25,0%) e na fase final da lactação foi observada maior frequência de isolamento de *Corynebacterium* sp. (36,4%) e

Streptococcus dysgalactiae (27,3%). Infecções mistas foram observadas na fase inicial (4,76%) e final da lactação (9,09%) (Tabela 4).

Tabela 3. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas (G1) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupo	Fase da lactação			Micro-organismos	Total
	Inicial	Intermediária	Final		
G1	8 (38,0%)	1 (12,5%)	0 (0,00%)	<i>Bacillus</i> spp.	9 (22,5%)
	0 (0,00%)	1 (12,5%)	4 (36,4%)	<i>Corynebacterium</i> sp.	5 (12,5%)
	1 (4,76%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (2,50%)
	10 (47,6%)	3 (37,5%)	1 (9,09%)	<i>Staphylococcus</i> spp.	14 (35,0%)
	1 (4,76%)	2 (25,0%)	1 (9,09%)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4 (10,0%)
	0 (0,00%)	1 (12,5%)	3 (27,3%)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4 (10,0%)
	0 (0,00%)	1 (12,5%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus</i> spp.	1 (2,50%)
	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (9,09%)	<i>Staphylococcus</i> β -hemolítico + <i>Streptococcus</i> α -hemolítico	1 (2,50%)
	1 (4,76%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (2,50%)
	21 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	Total	40 (100%)

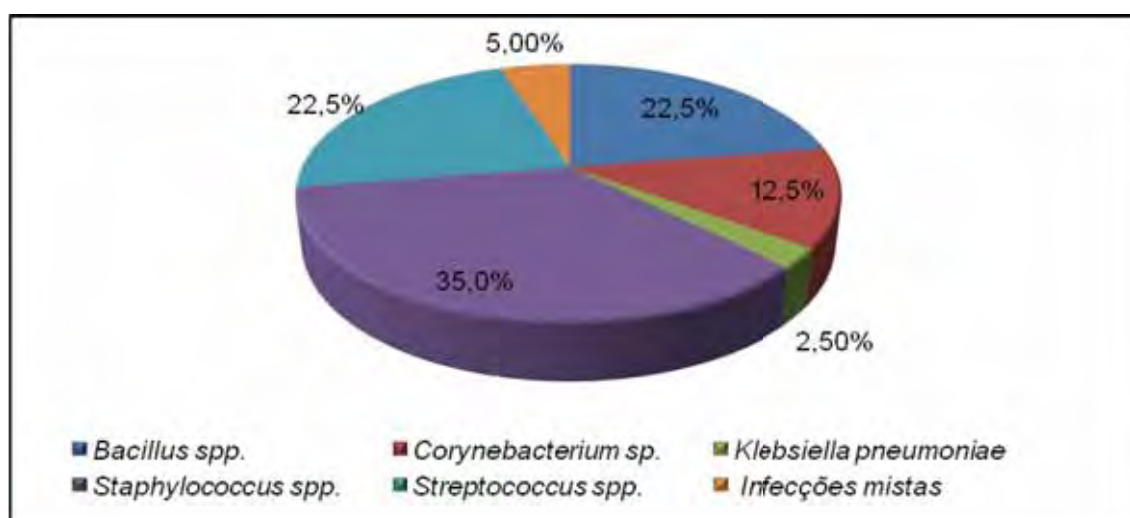


Figura 6. Frequência de micro-organismos isolados em amostras de leite de búfalas Murrah primíparas (G1) durante uma lactação completa.

Das 352 amostras de leite colhidas das fêmeas com duas a três lactações (G2) houve crescimento bacteriano em 49 amostras (Tabela 4 e Figura 7). A maioria dos isolamentos bacterianos na fase inicial da lactação foi de *Staphylococcus* spp. (40,0%), *Streptococcus agalactiae* (40,0%) e infecções mistas (5,00%). *Streptococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae* também foram isolados na fase intermediária da lactação com uma frequência de 57,2% e 19,0%, respectivamente. Na fase final da lactação foi verificado maior

isolamento de colônias do gênero *Corynebacterium* sp. (87,5%) (Tabela 5 e Figura 8)

Tabela 4. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com duas a três lactações (G2) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupo	Fase da lactação			Micro-organismos	Total
	Inicial	Intermediária	Final		
G2	0 (0,00%)	0 (0,00%)	7 (87,5%)	<i>Corynebacterium</i> sp.	7 (14,3%)
	0 (0,00%)	1 (4,76%)	0 (0,00%)	<i>Pasteurella multocida</i>	1 (2,04%)
	8 (40,0%)	1 (4,76%)	0 (0,00%)	<i>Staphylococcus</i> spp.	9 (18,4%)
	8 (40,0%)	4 (19,0%)	1 (12,5%)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	13 (26,5%)
	1 (5,00%)	2 (9,52%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3 (6,12%)
	0 (0,00%)	12 (57,2%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus</i> spp.	12 (24,5%)
	1 (5,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus</i> α -hemolítico	1 (2,04%)
	1 (5,00%)	1 (4,76%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	2 (4,08%)
	1 (5,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Staphylococcus</i> β -hemolítico	1 (2,04%)
	20 (100%)	21 (100%)	8 (100%)	Total	49 (100%)

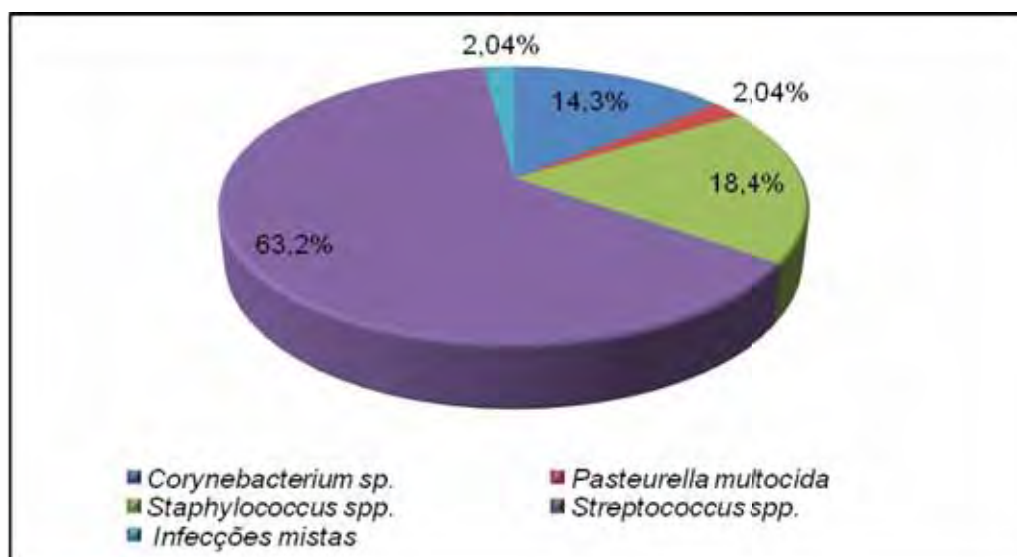


Figura 7. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com duas a três lactações (G2) durante uma lactação completa.

Das 346 amostras de leite colhidas das fêmeas com mais de três lactações (G3) houve crescimento bacteriano em 30 amostras (Tabela 5 e Figura 8). Na fase inicial da lactação foi observado maior número de isolamentos de *Streptococcus agalactiae* (50,0%) e *Staphylococcus* spp. (25,0%). Na fase intermediária, verificou-se maior isolamento de *Streptococcus* spp. (30,0%), *Streptococcus agalactiae* (30,0%) e *Staphylococcus aureus* (14,3%) e durante a fase final da lactação foi mais frequente o isolamento de *Corynebacterium* sp. (78,9%) e *Streptococcus agalactiae* (21,1%) (Tabela 6).

Tabela 5. Resultado absoluto e relativo dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupo	Fase da lactação			Micro-organismos	Total
	Inicial	Intermediária	Final		
G3	1 (25,0%)	0 (0,00%)	15 (78,9%)	<i>Corynebacterium</i> sp.	16 (53,3%)
	0 (0,00%)	1 (14,3%)	0 (0,00%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (3,33%)
	1 (25,0%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<i>Staphylococcus</i> spp.	1 (3,33%)
	2 (50,0%)	3 (42,8%)	4 (21,1%)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	9 (30,0%)
	0 (0,00%)	3 (42,8%)	0 (0,00%)	<i>Streptococcus</i> spp.	3 (3,33%)
	4 (100%)	7 (100%)	19 (100%)	Total	30 (100%)

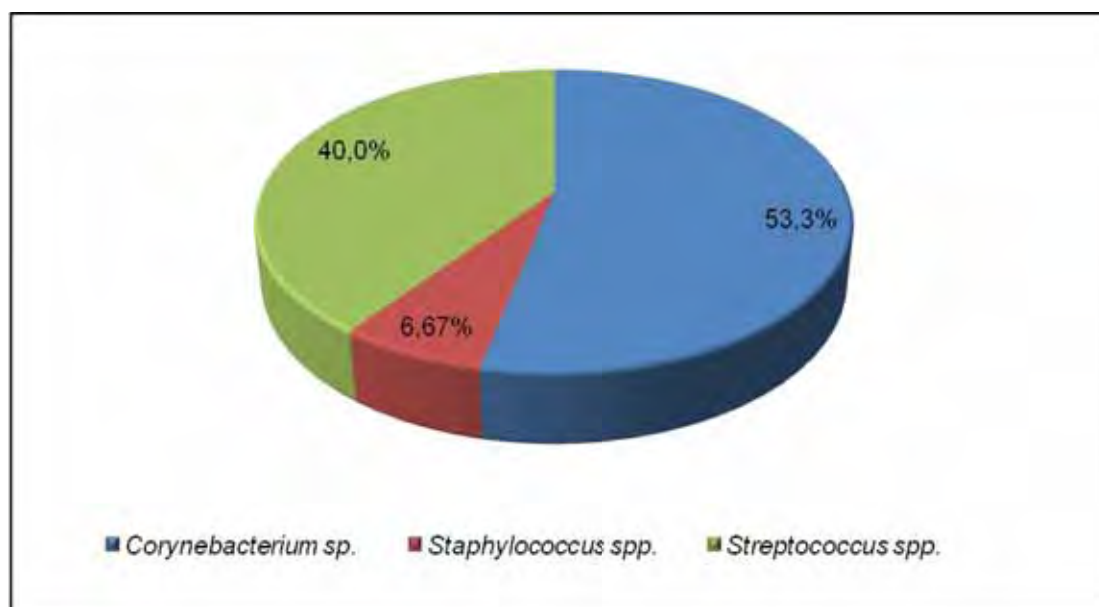


Figura 8. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah com mais de três lactações (G3) durante uma lactação completa.

No presente estudo foi encontrado porcentual de isolamento microbiológico nas amostras de leite dos animais do G1 de 52,7%, 20,0% e 27,5%, na fase inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente, e de 40,8%, 42,8% e 16,3%, respectivamente, nas amostras de leite dos animais do G2 (Figura 9). Nas amostras de leite dos animais do G3, foi observado 9,70%, 20,7% e 28,4% de isolamentos bacterianos na fase inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente (Figura 9). Os resultados da análise microbiológica das amostras de leite do G1 e G2 são semelhantes aos obtidos por Costa et al. (1997), que descreveram maior número de isolamentos bacterianos na fase inicial da lactação, seguido de diminuição da frequência com o evoluir da lactação, enquanto que os resultados do G3 foram

semelhantes aos descritos por Bastos e Birgel (2011), que observaram aumento na frequência de isolamentos ao longo da lactação.

A alta frequência de isolamentos de micro-organismos nas fêmeas primíparas pode estar relacionada ao fato destes animais ainda não terem desenvolvido imunidade contra doenças típicas das fêmeas lactantes.

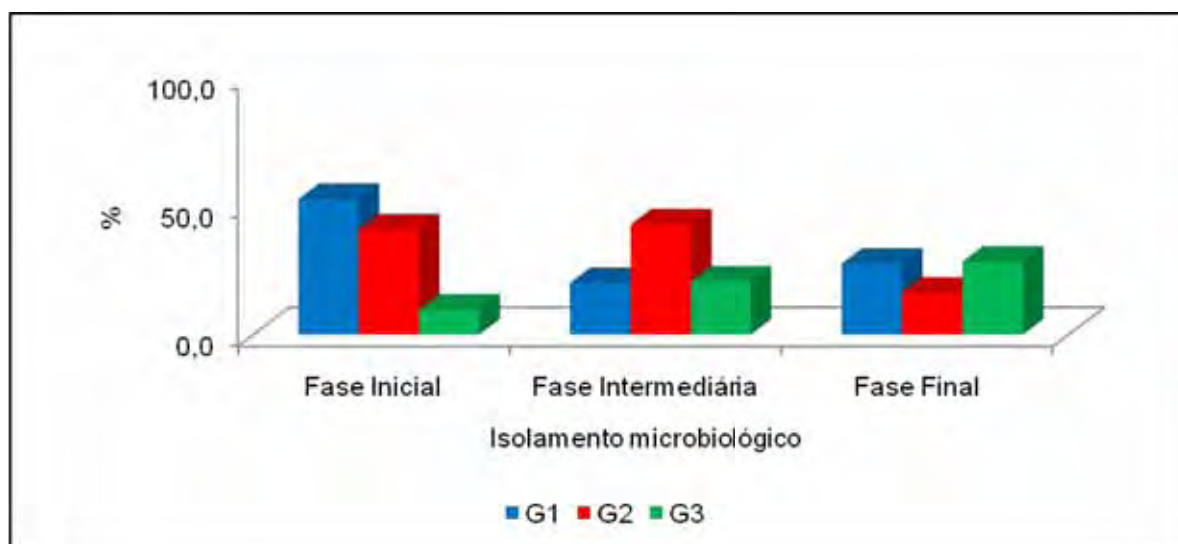


Figura 9. Frequência de micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) na fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Os resultados dos antibiogramas indicaram que 94,0% dos isolados bacterianos foram sensíveis à gentamicina, 88,0% ao ceftiofur, 88,0% à cefoperazona, 84,3% à ampicilina, 78,3% à oxacilina, 74,7% à penicilina, 71,1% à enrofloxacina, 67,5% à neomicina e 60,2% ao sulfametoxazol/trimetoprim (Figura 10).

Foi observada 39,8% de resistência dos isolados ao sulfametoxazole/trimetoprim, 32,5% à neomicina, 28,9% à enrofloxacina, 25,3% à penicilina, 21,7% à oxacilina, 15,7% à ampicilina, 12,0% ao ceftiofur, 12% à cefoperazona e 6,00% à gentamicina (Figura 10).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Cunha et al. (2006), cujos micro-organismos isolados nas amostras de leite de búfalas apresentaram um percentual de sensibilidade de 97,9% para gentamicina, 90,9% para enrofloxacina, 77,8% para sulfametoxazol/trimetoprim e 65,7%

para a penicilina. Os mesmos autores também sugerem como protocolo de tratamento da mastite a utilização sistêmica da enrofloxacina associada à administração intramamária da gentamicina.

Multirresistência foi observada em 30,1% dos isolados bacterianos, sendo que 4% apresentaram resistência a três antibióticos, 16% resistência a quatro antibióticos e 76% resistência a cinco ou mais antibióticos, simultaneamente (Figura 10).

A alta porcentagem de resistência à penicilina, neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim e a presença de cepas multirresistentes verificada no estudo pode estar relacionada ao uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) dos princípios ativos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os micro-organismos, possibilitando a seleção de cepas resistentes, constituindo sério problema de saúde pública (FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2012).

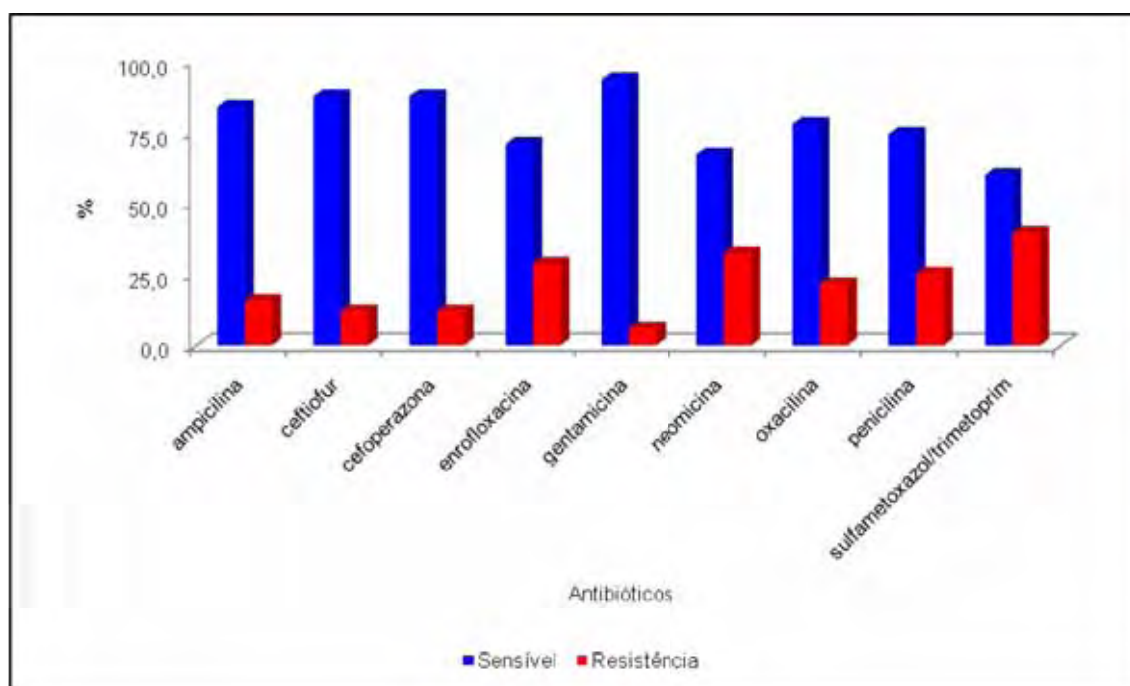


Figura 10. Perfil de sensibilidade e de resistência antimicrobiano dos micro-organismos isolados no leite de búfalas Murrah.

5.5 Índices agrometeorológicos

Os resultados dos índices agrometeorológicos (temperatura máxima absoluta, temperatura mínima absoluta, temperatura máxima mensal, temperatura mínima mensal, temperatura média, evotranspiração potencial –

ETP, precipitação e dias com chuva – DCCH) foram obtidos junto ao Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e são apresentados na Tabela 6 e Figura 11.

De acordo com a pluviosidade obtida, 7 meses foram classificados como secos e 12 meses como chuvosos (adaptado de ZAFALON et al., 2010).

Tabela 6. Resenha meteorológica da região de São Carlos - SP, no período de 01/05/2011 a 31/10/11/2012.

Mês/Ano	Temperatura máxima absoluta (°C)		Temperatura mínima absoluta (°C)		Temperatura máxima mensal (°C)		Temperatura mínima mensal (°C)		Temperatura média (°C)		ETP ¹ (mm)	Precipitação (mm)	DCCH ²	Classificação
	absoluta (°C)	absoluta (°C)	mínima absoluta (°C)	mínima absoluta (°C)	máxima mensal (°C)	máxima mensal (°C)	mínima mensal (°C)	mínima mensal (°C)	máxima mensal (°C)	média (°C)				
Maio/2011	29,0	8,0	24,7	13,4	19,0	61	5,5	2	Seco					
Junho/2011	27,8	1,5	24,0	11,3	17,6	49	42	4	Seco					
Julho/2011	29,3	6,2	25,7	13,5	19,6	59	0,1	1	Seco					
Agosto/2011	33,4	3,6	27,7	15,0	21,3	76	11,6	4	Seco					
Setembro/2011	35,4	8,1	29,5	15,0	22,3	91	13	3	Seco					
Outubro/2011	33,6	12,1	27,9	17,3	22,6	109	141,4	11	Chuvoso					
Novembro/2011	32,0	10,9	28,1	16,4	22,2	112	142,2	9	Chuvoso					
Dezembro/2011	31,8	13,6	28,9	17,9	23,4	125	221,1	12	Chuvoso					
Ano de 2012														
Janeiro/2012	31,2	15,1	27,0	18,0	22,5	119	266,1	22	Chuvoso					
Fevereiro/2012	34,2	18,0	30,5	19,6	25,0	129	97,7	11	Chuvoso					
Março/2012	32,6	15,0	29,2	18,4	23,8	113	79,3	10	Chuvoso					
Abril/2012	32,1	14,8	27,9	17,9	22,9	85	147,5	7	Chuvoso					
Maio/2012	27,9	10,0	23,9	13,8	18,8	60	103,1	8	Chuvoso					
Junho/2012	27,5	11,2	23,2	14,5	18,9	53	190,3	9	Chuvoso					
Julho/2012	28,9	5,2	24,5	12,4	18,4	56	42,7	4	Seco					
Agosto/2012	29,7	9,3	26,2	14,1	20,1	71	2,4	1	Seco					
Setembro/2012	35,0	7,4	28,9	15,2	22,0	90	77,4	5	Chuvoso					
Outubro/2012	36,8	13,5	30,9	18,8	24,9	132	86,7	6	Chuvoso					
Novembro/2012	34,0	13,5	28,9	17,7	23,3	117	130,1	11	Chuvoso					

¹ Evapotranspiração potencial

² DCCH: Dias com chuva

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas – SP

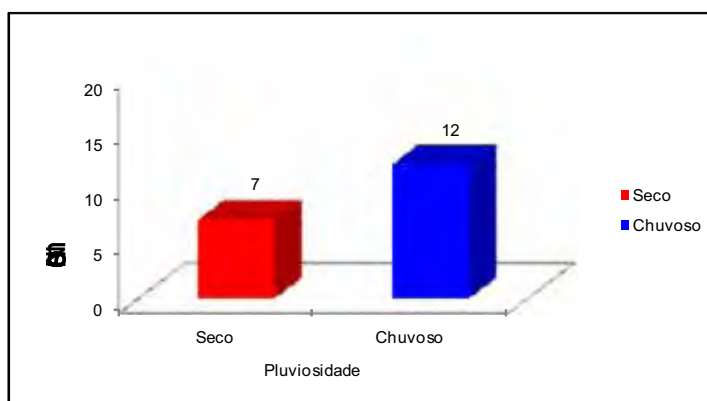


Figura 11. Número de meses classificados como seco e chuvoso no período de maio de 2011 a novembro de 2012.

5.6 Influência da pluviosidade no isolamento de micro-organismos do leite de búfalas Murrah

Embora tenha sido observado maior número de isolamentos de micro-organismos nas amostras de leite das búfalas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) no período chuvoso, a pluviosidade não teve efeito significativo na frequência de isolamento de micro-organismos (Tabela 7 e Figura 12). *Staphylococcus coagulase negativa* (*Staphylococcus* spp.) (38,4%) e *Streptococcus agalactiae* (28,8%) foram os principais gêneros de micro-organismos isolados durante o período seco e *Corynebacterium* sp. (23,5%) e *Streptococcus* spp. (32,3%) foram os principais gêneros de micro-organismos isolados durante o período chuvoso.

Ferreira (2006) e Zafalon et al. (2008) observaram influência significativa da pluviosidade no isolamento de *S. aureus* no leite de bovinos, verificando maior prevalência deste micro-organismo durante os períodos com maior pluviosidade. Zafalon et al. (2008) ressalta também a dificuldade de se manter condições adequadas de higiene no período chuvoso.

Provavelmente a ausência de influência da pluviosidade no isolamento de micro-organismos no leite das búfalas possa estar relacionada ao hábito dos bubalinos de adentrarem em terrenos alagadiços.

Tabela 7. Resultado absoluto e relativo do isolamento microbiológico no leite de búfalas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) no período seco e chuvoso.

Micro-organismo	Período Seco (7 Meses)	Período Chuvoso (12 Meses)	Total de isolamentos
<i>Bacillus</i> spp.	9 (7,56%)	0 (0,00%)	9 (7,56%)
<i>Corynebacterium</i> spp.	0 (0,00%)	28 (23,5%)	28 (23,5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (0,84%)	0 (0,00%)	1 (0,84%)
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (0,84%)	0 (0,00%)	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,84%)	0 (0,00%)	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	19 (16,0%)	5 (4,20%)	24 (20,2%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15 (12,6%)	11 (9,24%)	26 (21,8%)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (1,68%)	5 (4,20%)	7 (5,88%)
<i>Streptococcus</i> spp.	0 (0,00%)	16 (13,4%)	16 (13,4%)
<i>Streptococcus</i> α -hemolítico	1 (0,84%)	0 (0,00%)	1 (1,68%)
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	0 (0,00%)	2 (1,68%)	2 (1,68%)
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Staphylococcus</i> β -hemolítico	0 (0,00%)	1 (0,84%)	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (0,84%)	0 (0,00%)	1 (0,84%)
<i>Staphylococcus</i> β -hemolítico + <i>Streptococcus</i> α -hemolítico	0 (0,00%)	1 (0,84%)	1 (0,84%)
Total	50 (42,0%)	69 (58,0%)	119 (100%)

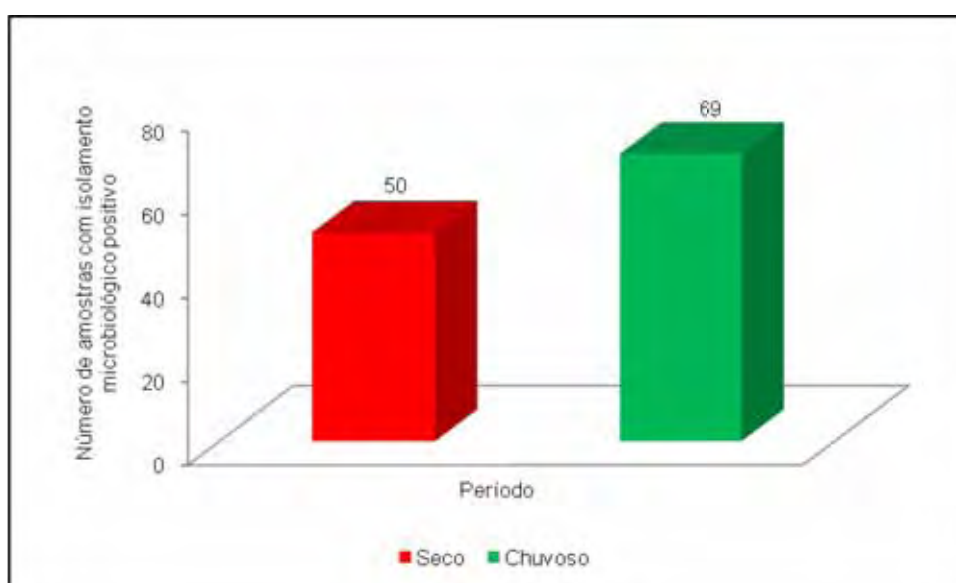


Figura 12. Número de amostras de leite de búfalas Murrah primíparas e pluríparas com isolamento microbiológico positivo no período seco e chuvoso.

5.7 Contagem de células somáticas (CCS)

Os valores da CCS encontrados nas amostras de leite (com isolamento microbiológico negativo) nos três grupos avaliados variaram de 1.000 a 199.000 células/mL, com uma média geral de 44.400 células/mL. Esta média é um pouco superior aos encontrados por Amaral et al. (2004), que observaram CCS de 24.000 células/mL no leite de um rebanho com animais da raça

Jafarabadi e Murrah e de Bastos e Birgel (2011) que observaram CCS de 30.500 células/mL no leite de búfalas Murrah.

Também foi observado aumento da contagem de células somáticas ao longo da lactação nos três grupos experimentais (Tabela 8 e Figura 13).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Bastos e Birgel (2011), os quais observaram aumento significativo na contagem de células somáticas no leite de búfalas ao longo da lactação, com valores de CCS de 36.000 células/mL na fase inicial, 54.500 células/mL na fase intermediária e 95.500 células/mL na fase final da lactação.

No início da lactação, observa-se um acréscimo no valor da CCS devido à maior quantidade de imunoglobulinas e, conseqüentemente, de células de defesa no colostro (VOLTOLINI et al., 2001). No final da lactação, também se verifica um acréscimo na CCS, devido a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária (HARMON;RENEAU, 1993; MONARDES, 1994).

Tabela 8. Médias e desvios padrão da CCS (células/mL) no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	23.600±25.200 ^{Aa}	31.200±22.900 ^{Ab}	34.400±35.200 ^{Aa}
G2	38.200±34.00 ^{Ba}	49.800±39.700 ^{Bab}	70.700±55.800 ^{Bb}
G3	55.500±48.100 ^{Bab}	46.400±40.300 ^{ABa}	61.500±52.200 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

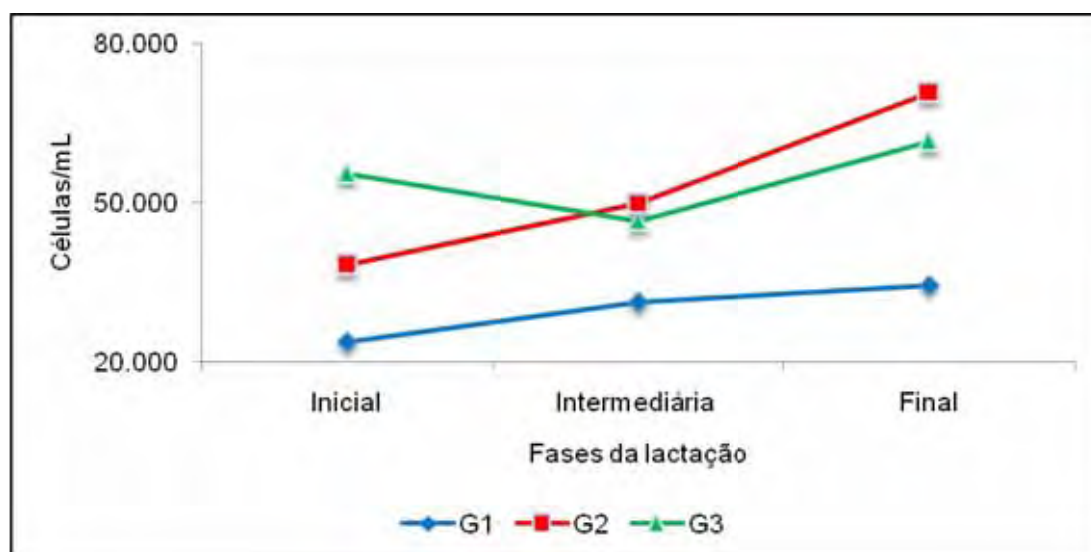


Figura 13. Variação da contagem de células somáticas (CCS) (células/mL) no leite de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8 Perfil bioquímico do soro lácteo

Os resultados das análises bioquímicas do soro lácteo de búfalas Murrah, com isolamento microbiológico negativo, primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3), durante uma lactação completa são apresentados nas Tabelas 9 a 20 e nas Figuras 14 a 25.

5.8.1 Atividade da gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo

Foi observado aumento significativo da atividade da GGT no soro lácteo dos animais dos três grupos experimentais ao longo da lactação (Tabela 9 e Figura 14).

Embora tenha ocorrido aumento da atividade desta enzima ao longo da lactação, estes valores foram inferiores daqueles obtidos por Rocha (2010), que encontrou média da atividade da enzima GGT de 3.190 U/L no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 3.470 U/L no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Como a GGT está envolvida com o transporte de aminoácidos do sangue para a glândula mamária e participa da biossíntese das proteínas do leite (KENNY, 1977; MEISTER, 1973; BAUMRUCKER; POCIUS, 1978), o incremento da sua atividade está relacionado à maior atividade do tecido mamário ao longo da lactação

Segundo Hoffmann e Solter (2008), a dosagem de GGT consiste ainda num método fácil e barato de avaliação da transferência de imunidade passiva ao neonato.

Tabela 9. Médias e desvios padrão da atividade da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três (G2) lactações e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	1662±532 ^{Aa}	1866±449 ^{Ab}	2346±413 ^{Ac}
G2	1837±616 ^{Ba}	1873±516 ^{Aa}	2125±423 ^{Ab}

G3	1669±581 ^{Aa}	1832±383 ^{Aa}	2174±534 ^{Ab}
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)			

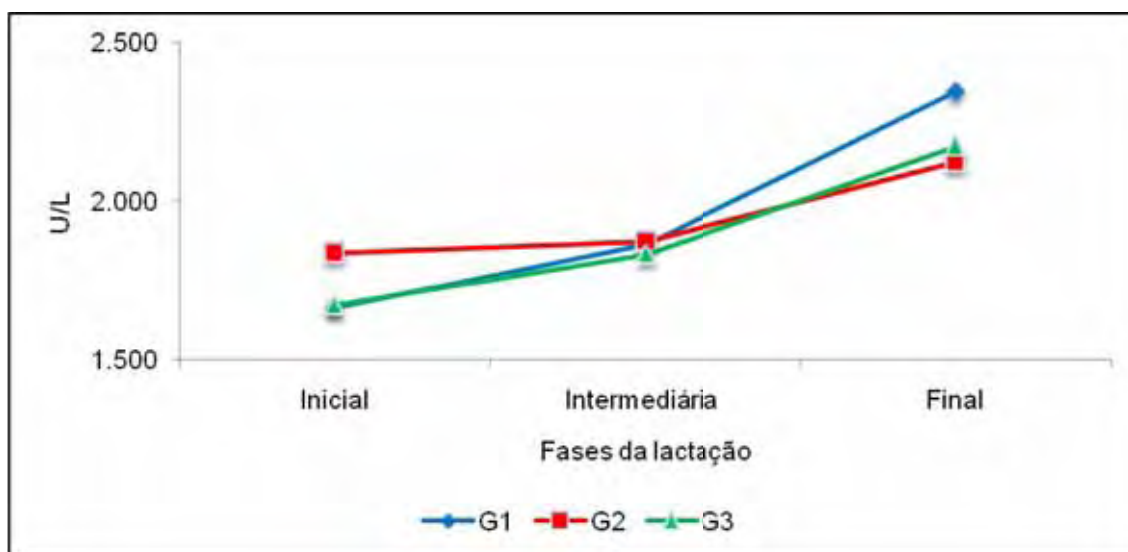


Figura 14. Variação da atividade da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.2 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) no soro lácteo

As fêmeas primíparas (G1) tiveram valores significativamente mais altos para a atividade da enzima fosfatase alcalina em relação às fêmeas pluríparas do G2 e do G3. Houve um aumento significativo da atividade desta enzima ao longo da lactação no soro lácteo dos animais de todos os grupos, sendo os maiores valores observados na fase final da lactação (Tabela 10 e Figura 15).

Estes valores também foram inferiores daqueles obtidos por Rocha (2010), que encontrou média da atividade da enzima ALP de 101 U/L no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e 84,2 U/L no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Fox e Kelly (2006) observaram que a atividade da enzima ALP no leite de bovinos foi menor na primeira semana de lactação e atingiu maior atividade na 28ª semana de lactação.

Como a enzima ALP está presente nas células mioepiteliais da glândula mamária (FOX; KELLY, 2006), acredita-se que ela desempenhe alguma função no processo de produção de leite.

Tabela 10. Médias e desvios padrão da atividade da enzima fosfatase alcalina (U/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	43,1±24,2 ^{Aa}	95,1±41,2 ^{Ab}	181±81,0 ^{Ac}
G2	33,9±16,4 ^{ABa}	80,1±46,9 ^{Bb}	166±110 ^{ABc}
G3	29,5±24,1 ^{Ba}	75,4±46,3 ^{Bb}	138±95,7 ^{Bc}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

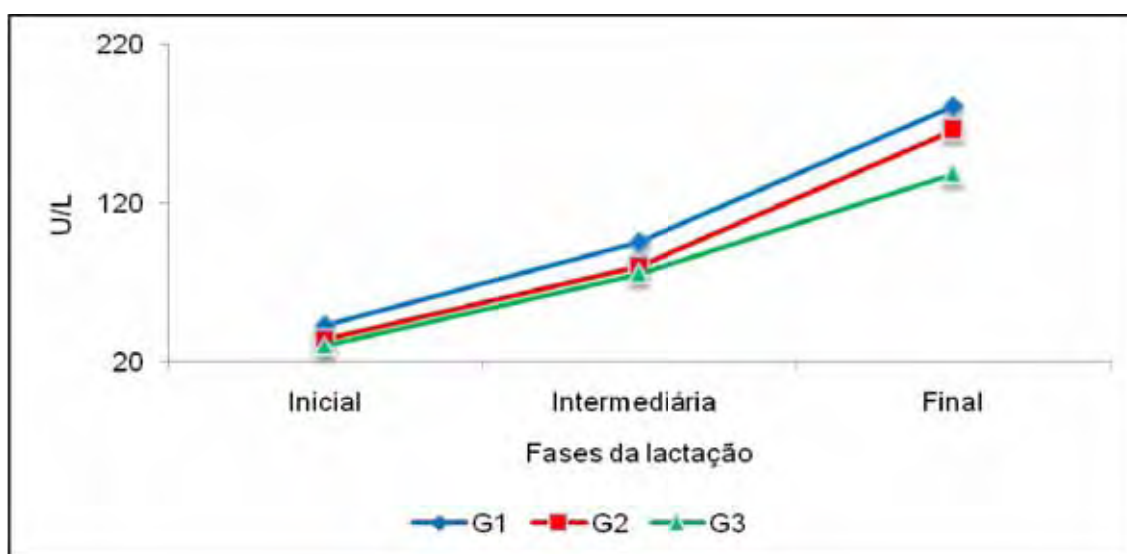


Figura 15. Variação da atividade da enzima fosfatase alcalina no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três (G2) lactações e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.3 Concentração de proteína total (PT) no soro lácteo

Os maiores valores da concentração de proteína total foram observados no soro lácteo das fêmeas bubalinas com duas a três lactações (G2). Verificou-se queda da concentração da proteína total no soro lácteo dos animais de todos os grupos experimentais entre a fase inicial e fase intermediária da lactação, seguida por aumento na fase final da lactação (Tabela 11 e Figura 16).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Hejtmánková et al. (2012), que observaram maiores valores de proteína total no leite de cabras na fase inicial e final da lactação e associaram este fato ao aumento da concentração dos componentes relacionados ao sistema imune (imunoglobulinas e proteínas de fase aguda). No final da lactação ocorre um

processo de inflamação asséptica para preparação da glândula mamária para a secagem (LEITINER; MERIN; SILANIKOVE, 2011).

Rocha (2010) encontrou média de concentração de proteína total de 0,99 g/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 1,18 g/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 11. Médias e desvios padrão da concentração de proteína total (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três (G2) lactações e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	1,45±0,21 ^{Aa}	1,38±0,16 ^{Ab}	1,54±0,12 ^{Aa}
G2	1,49±0,21 ^{Aab}	1,44±0,13 ^{Aa}	1,55±0,17 ^{Ab}
G3	1,46±0,23 ^{Ab}	1,40±0,11 ^{Aa}	1,52±0,15 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

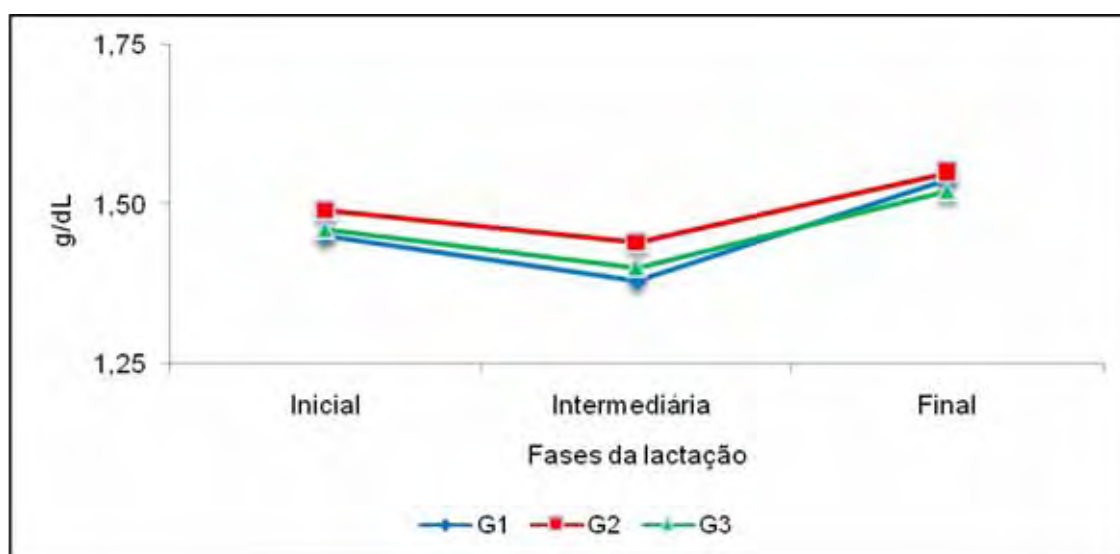


Figura 16. Variação da concentração de proteína total (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.4 Concentração de albumina (Alb) no soro lácteo

Não foi observada diferença significativa da concentração de albumina no soro lácteo dos animais dos três grupos durante a lactação. Entretanto, foi observada variação significativa da concentração de albumina na fase final da lactação no soro lácteo dos animais do G1 e do G3 (Tabela 12 e Figura 17).

Freitas et al. (2006) e Freitas Filho et al. (2009) observaram redução da síntese de caseína no leite de vacas ao longo da lactação e aumento de soroproteínas, dentre elas a albumina. Rocha (2010) encontrou média da concentração albumina de 0,06 g/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 0,09 g/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 12. Médias e desvios padrão da concentração de albumina (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	0,08±0,04 ^{Aa}	0,08±0,04 ^{Aa}	0,09±0,02 ^{Ab}
G2	0,08±0,04 ^{Aa}	0,10±0,11 ^{Aa}	0,09±0,02 ^{Aa}
G3	0,09±0,14 ^{Aa}	0,08±0,09 ^{Aa}	0,09±0,02 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Dunn ($P>0,05$)

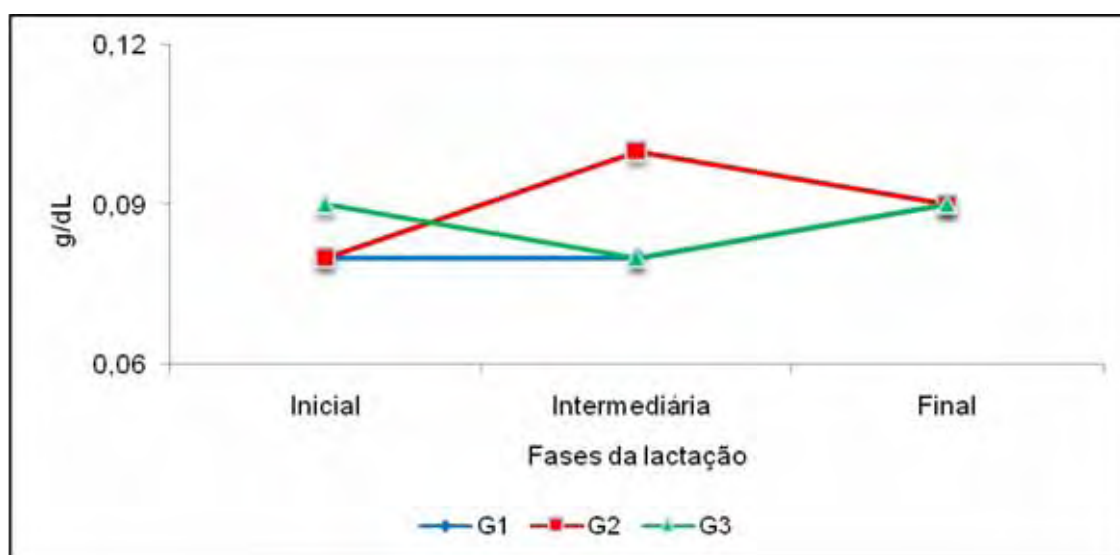


Figura 17. Variação da concentração de albumina (g/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.5 Concentração de cálcio total (Ca) no soro lácteo

Os maiores valores para a concentração de cálcio total no soro lácteo foram observados nos animais do G3 e estes valores diferiram significativamente em relação aos valores encontrados para os animais do G1 e G2 nas fases inicial, intermediária e final da lactação. Houve uma queda significativa da concentração de cálcio total no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) ao longo da lactação (Tabela 13 e Figura 18).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Gaucheron (2005) que observou queda na concentração de cálcio total ao longo da lactação no leite de vacas.

Rocha (2010) encontrou média de concentração cálcio total de 38,5 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 42,2 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 13. Médias e desvios padrão da concentração de cálcio total (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	38,9±6,84 ^{Aa}	32,3±4,80 ^{Ab}	29,5±4,12 ^{Ac}
G2	38,2±7,13 ^{Aa}	31,5±3,86 ^{Ab}	28,8±4,70 ^{Ac}
G3	41,8±8,14 ^{Ba}	35,2±5,45 ^{Bb}	32,4±6,77 ^{Bc}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

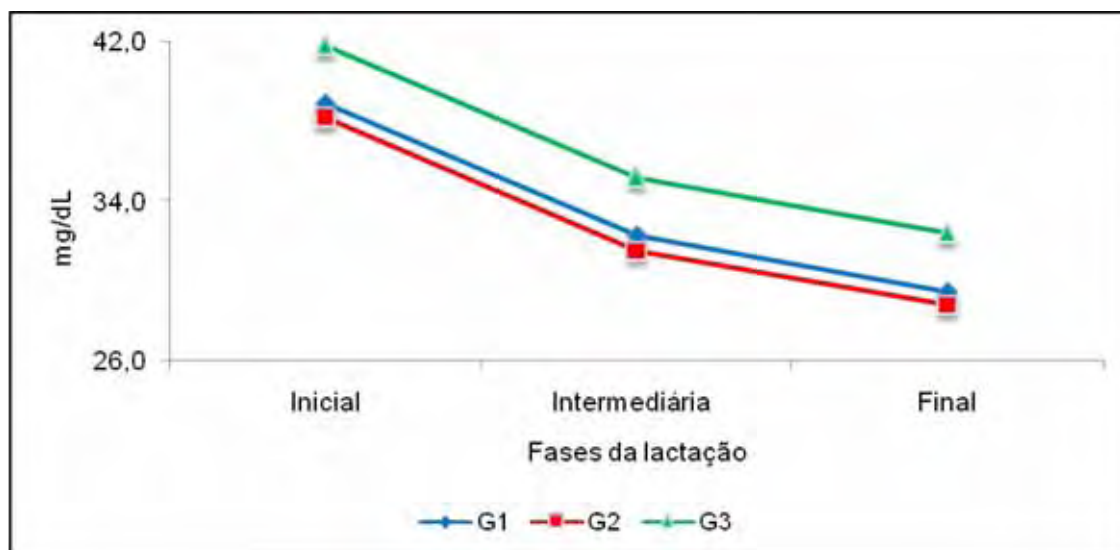


Figura 18. Variação da concentração de cálcio total (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.6 Concentração de fósforo (P) no soro lácteo

As fêmeas primíparas (G1) apresentaram valores significativamente mais altos para a concentração de fósforo no soro lácteo na fase final da lactação em relação aos animais do G2 e G3 (Tabela 14 e Figura 19).

Houve aumento da concentração de fósforo no soro lácteo dos animais do G1 durante a lactação. Nas fêmeas bubalinas do G2 e G3 houve aumento da concentração de fósforo da fase inicial para a fase intermediária seguida por queda na fase final da lactação (Tabela 14 e Figura 19).

Gaucheron (2005) também observou aumento seguido de queda da concentração de fósforo no leite de vacas ao longo da lactação.

Rocha (2010) encontrou média de concentração fósforo de 35,6 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 35,5 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 14. Médias e desvio padrão da concentração de fósforo (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	39,3±6,04 ^{ABa}	50,4±7,21 ^{Ab}	56,6±10,1 ^{Ac}
G2	42,8±8,48 ^{Ba}	51,2±8,96 ^{Ab}	51,4±10,2 ^{Bb}

G3	38,3±11,1 ^{Aa}	44,2±11,3 ^{Bb}	40,8±11,6 ^{Cc}
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)			

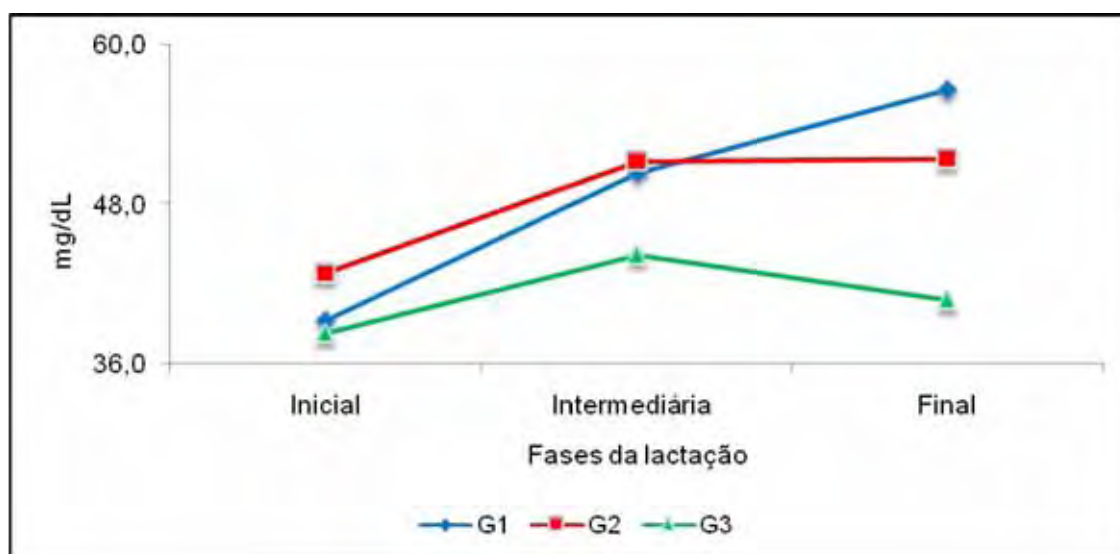


Figura 19. Variação da concentração de fósforo (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.7 Concentração de magnésio (Mg) no soro lácteo

As menores concentrações de magnésio foram observadas no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) na fase inicial da lactação e as maiores concentrações foram observadas nas fêmeas pluríparas do G2 na fase final da lactação (Tabela 15 e Figura 20).

Embora a concentração de magnésio no soro lácteo tenha aumentado durante a lactação nos animais do G1 e G2, este aumento foi significativo apenas para os animais do G2. Foi observada queda significativa da concentração de magnésio da fase intermediária para a fase final da lactação nos animais do G3 (Tabela 15 e Figura 20).

Variações na concentração de magnésio ao longo da lactação também foram observadas por Rangel (2011), que notou aumento do teor de sólidos na fase final da lactação no leite de búfalas Murrah, e Bastos e Birgel (2011), que verificaram redução do teor de sólidos totais no leite de búfalas Murrah na fase final da lactação.

Rocha (2010) encontrou média de concentração de magnésio de 6,44 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 7,12 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 15. Médias e desvios padrão da concentração de magnésio (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	7,34±1,20 ^{Aa}	7,50±1,09 ^{Aa}	8,19±1,37 ^{Aa}
G2	7,59±1,44 ^{Aa}	7,91±1,27 ^{ABa}	8,80±1,28 ^{Ab}
G3	7,65±1,59 ^{Aa}	8,04±1,26 ^{Ba}	7,95±3,30 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

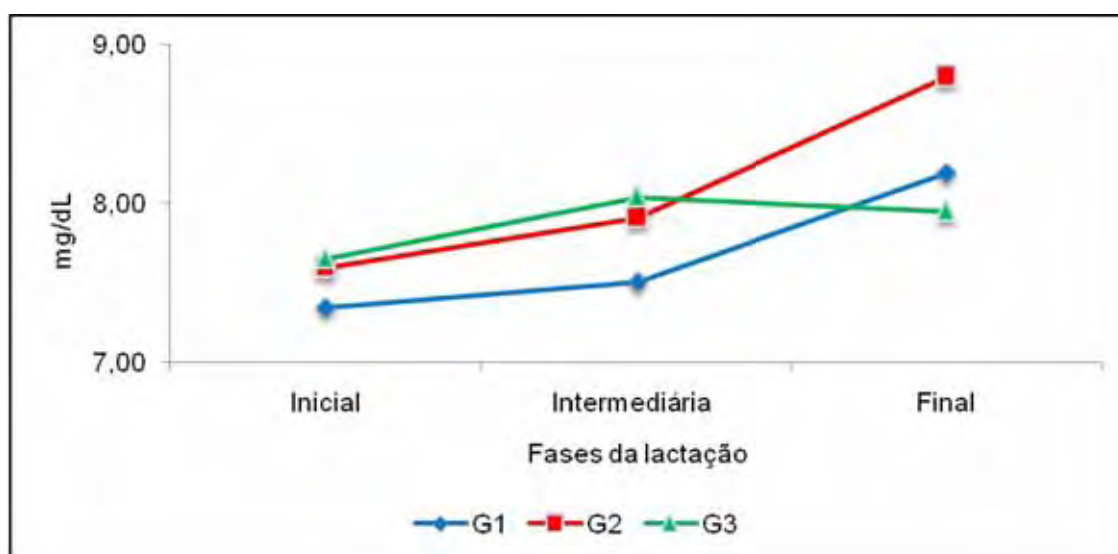


Figura 20. Variação da concentração de magnésio (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.8 Concentração de cloretos (Cl) no soro lácteo

Os animais do G1 obtiveram as menores concentrações de cloretos na fase inicial da lactação e os animais do G2 tiveram a maior concentração de cloretos na fase final da lactação. Não foram observadas variações significativas das concentrações de cloretos no soro lácteo dos animais avaliados ao longo da lactação (Tabela 16 e Figura 21).

Por outro lado, Bastos e Birgel (2011) verificaram aumento significativo da concentração de cloretos nos animais mais velhos e na fase final da lactação

de búfalas Murrah e relacionaram este achado ao maior número de isolamentos bacterianos no decorrer das lactações. Zafalon et al. (2005) encontraram aumento progressivo da concentração de cloretos no leite de vacas e atribuíram este aumento à possíveis descamações das células secretoras da glândula mamária.

Tabela 16. Médias e desvios padrão da concentração de cloretos (mEq/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	159±24,1 ^{Ba}	170±17,5 ^{Aa}	168±22,2 ^{ABa}
G2	171±25,7 ^{Aa}	173±21,1 ^{Aa}	176±25,7 ^{Ba}
G3	165±21,3 ^{Aa}	166±15,6 ^{Aa}	163±26,3 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

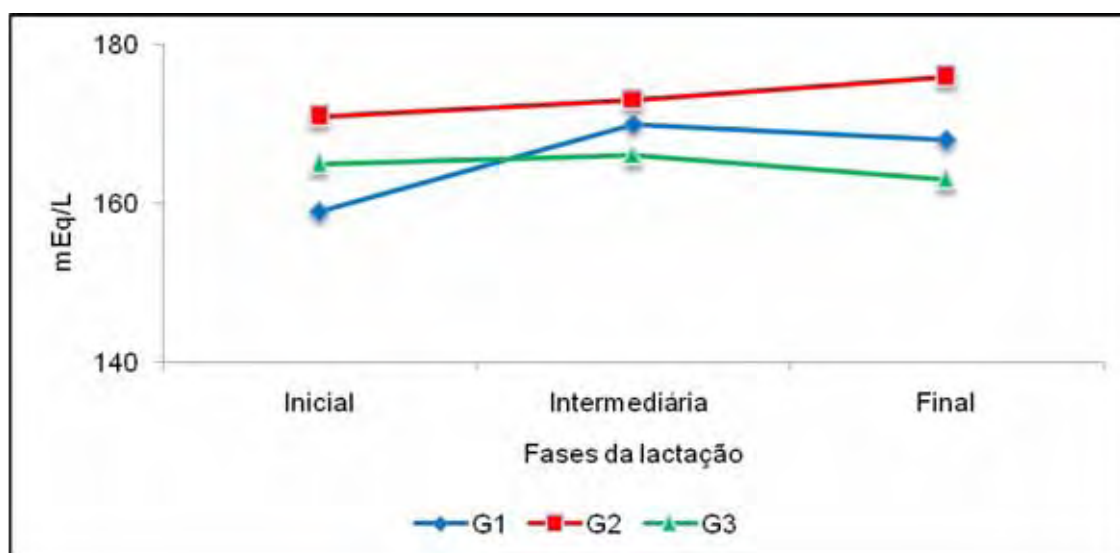


Figura 21. Variação da concentração de cloretos (mEq/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), fêmeas com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.9 Concentração de ferro (Fe) no soro lácteo

As maiores concentrações de ferro foram observadas nos animais do G2. Houve queda da concentração de ferro no soro lácteo das fêmeas ao longo da lactação, sendo esta queda significativa para os animais do G1 (Tabela 17 e Figura 22).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Górska e Oprzadek (2011), que observaram menores concentrações de ferro no leite de novilhas e maiores concentrações no leite de vacas pluríparas, mas estas diferenças não foram significativas. Segundo Dorea (2000), algumas das propriedades bacteriostáticas do leite estão estritamente associadas com os níveis e a biodisponibilidade deste elemento.

Rocha (2010) encontrou média de concentração ferro de 8,18 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e 4,18 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 17. Médias e desvios padrão da concentração de ferro ($\mu\text{g/dL}$) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	6,96 \pm 18,4 ^{Aa}	6,67 \pm 10,5 ^{Ab}	5,35 \pm 6,25 ^{Ab}
G2	10,7 \pm 24,0 ^{Aa}	7,61 \pm 17,3 ^{Aa}	6,29 \pm 8,82 ^{Aa}
G3	9,44 \pm 22,1 ^{Aa}	6,24 \pm 17,3 ^{Aa}	5,35 \pm 7,77 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Dunn ($P>0,05$)

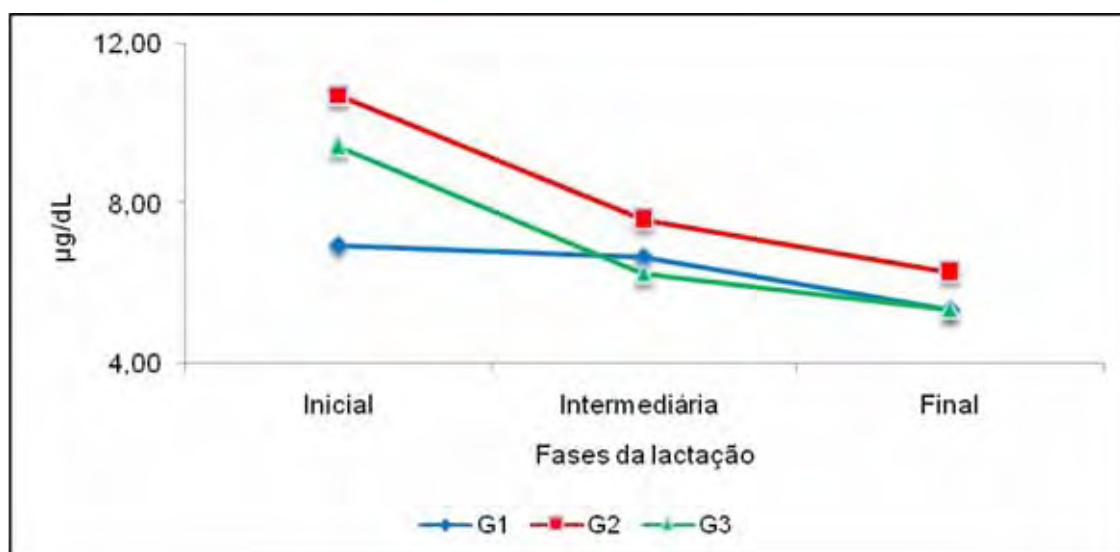


Figura 22. Variação da concentração de ferro ($\mu\text{g/dL}$) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.10 Concentração de cálcio ionizado (Cai) no soro lácteo

Os maiores valores da concentração de cálcio ionizado foram observados no soro lácteo dos animais do G3 (Tabela 18 e Figura 23).

Houve diminuição significativa da concentração de cálcio ionizado no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) entre a fase inicial e final da lactação (Tabela 18 e Figura 23).

A concentração dos minerais no leite pode variar significativamente, já que depende de vários fatores, dentre eles a nutrição e o estado fisiológico do animal (GÓRSKA: OPRZADEK, 2011).

Rocha (2010) encontrou média de cálcio ionizado de 3,41 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 3,88 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas aos 30 dias de lactação.

Tabela 18. Médias e desvio padrão da concentração de cálcio ionizado (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	2,57±0,41 ^{Aa}	2,58±0,34 ^{Aa}	2,30±0,38 ^{Ab}
G2	2,62±0,48 ^{Aa}	2,55±0,34 ^{Aa}	2,38±0,39 ^{Ab}
G3	2,76±0,37 ^{Ba}	2,92±0,50 ^{Ba}	2,72±0,54 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

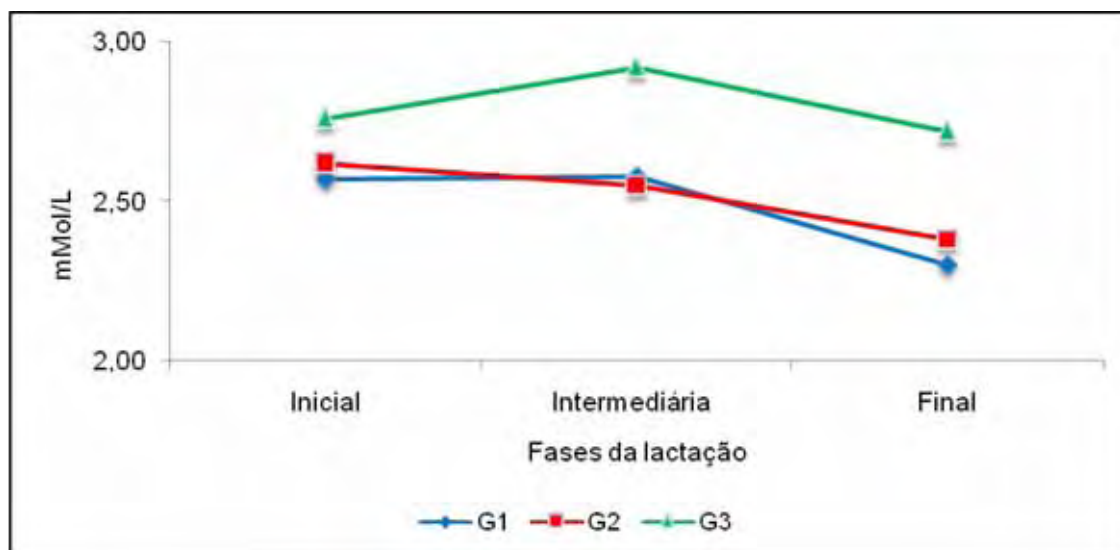


Figura 23. Variação da concentração de cálcio ionizado (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.11 Concentração de sódio (Na) no soro lácteo

Notou-se aumento da concentração de sódio no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) ao longo das fases da lactação (Tabela 19 e Figura 24).

Na glândula mamária há um equilíbrio do gradiente de concentração dos íons sódio, potássio e cloretos entre o leite e o plasma, (SHENNAN; PEAKER, 2000). De acordo com Zafalon et al. (2005), o aumento da concentração de sódio ao longo da lactação pode estar relacionado ao aumento da descamação do tecido mamário durante a lactação, que altera a permeabilidade das junções paracelulares do tecido mamário acarretando um maior extravasamento deste íon para o leite.

Rocha (2010) obteve uma média da concentração de cloretos de 149 mMol/L e de 147 mMol/L no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e pluríparas 30 dias após o parto, respectivamente.

Tabela 19. Médias e desvios padrão da concentração de sódio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final

G1	156±24,2 ^{Aa}	167±16,4 ^{Ab}	174±16,2 ^{Ab}
G2	162±23,5 ^{Aa}	172±18,2 ^{Ab}	178±11,8 ^{Ab}
G3	161±21,0 ^{Aa}	166±15,9 ^{Ab}	169±15,3 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

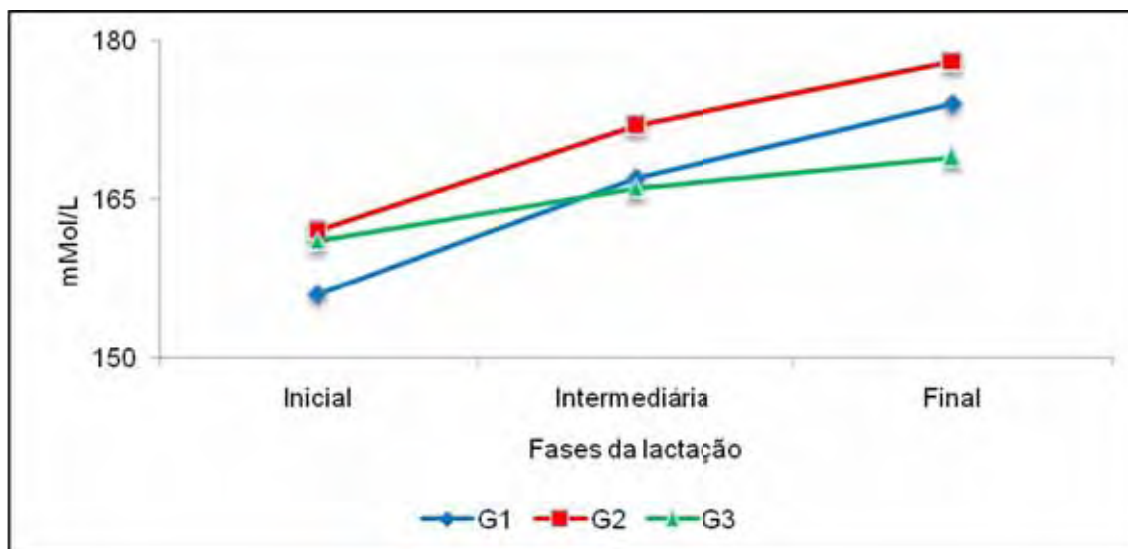


Figura 24. Variação da concentração de sódio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.8.12 Concentração de potássio (K) no soro lácteo

Foi observada queda significativa nos valores da concentração de potássio nos animais de todos os grupos entre na fase intermediária e final da lactação (Tabela 20 e Figura 25).

A redução dos teores de potássio pode estar relacionada à manutenção do equilíbrio osmótico, uma vez que o aumento da concentração de sódio leva à redução da concentração de potássio no leite (ARNEY; PHILIPS, 2005).

Rocha (2010) observou concentração de potássio de 34,8 mMol/L no soro lácteo de fêmeas primíparas e 38,2 mMol/L no soro lácteo de fêmeas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 20. Médias e desvios padrão da concentração de potássio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final

G1	32,0±5,56 ^{Aa}	28,4±4,95 ^{Ab}	28,0±2,64 ^{Ab}
G2	31,6±5,20 ^{Aa}	28,6±2,78 ^{Ab}	27,2±2,81 ^{Ab}
G3	31,9±5,41 ^{Aa}	27,1±2,66 ^{Ab}	27,3±2,27 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

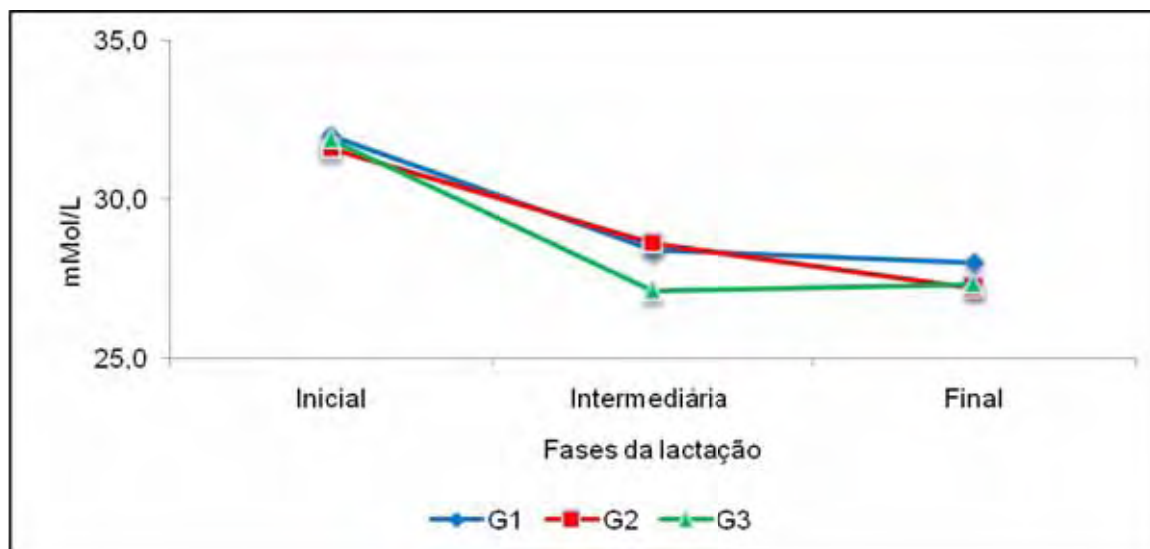


Figura 25. Variação da concentração de potássio (mMol/L) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9 Fracionamento eletroforético das proteínas da secreção láctea

O proteinograma do soro lácteo obtido em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) possibilitou a detecção de até 24 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 12.000 a 235.000 Da. Destas, imunoglobulina A - IgA (160.000 Da), lactoferrina (79.500 Da), albumina sérica (64.000 Da), imunoglobulina G - IgG (83.000 Da), β -lactoglobulina (18.500 Da) e α -lactoalbumina (15.000 Da) foram analisadas em razão da sua importância para avaliação do estado de saúde da glândula mamária (Figura 26).

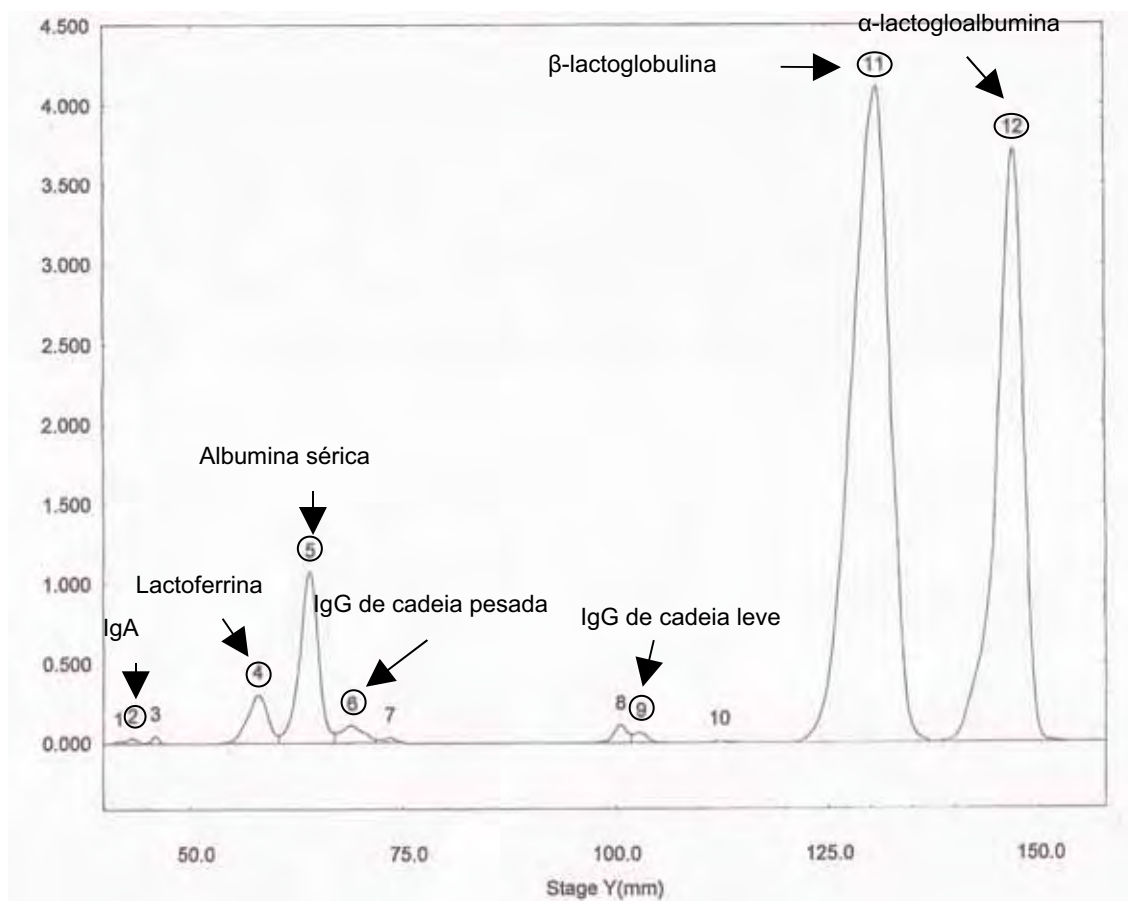


Figura 26. Perfil eletroforético do proteinograma do soro lácteo de búfala Murrah sadia e com isolamento microbiológico negativo.

5.9.1 Concentração de imunoglobulina A (IgA) no soro lácteo

Com relação à concentração de IgA no soro lácteo, houve queda desta imunoglobulina entre a fase inicial e a fase intermediária da lactação em todos os grupos avaliados. Somente os animais do G2 e do G3 apresentaram aumento dos níveis de IgA na fase final da lactação (Tabela 21 e Figura 27)

Segundo Kocina, Antane e Lusic (2012), a quantidade de IgA varia consideravelmente entre indivíduos e que esta imunoglobulina desempenha um papel importante na proteção do tecido mamário.

Rocha (2010) observou concentração de IgA de 2,33 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 5,32 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 21. Médias e desvios padrão da concentração de IgA (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três

lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	0,57±1,59 ^{Aa}	0,16±0,56 ^{Aa}	0,19±0,59 ^{Aa}
G2	0,52±1,00 ^{Aa}	0,09±0,29 ^{Aa}	0,51±1,44 ^{Aa}
G3	0,59±1,24 ^{Aa}	0,23±0,57 ^{Aa}	1,32±3,47 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Dunn ($P>0,05$)

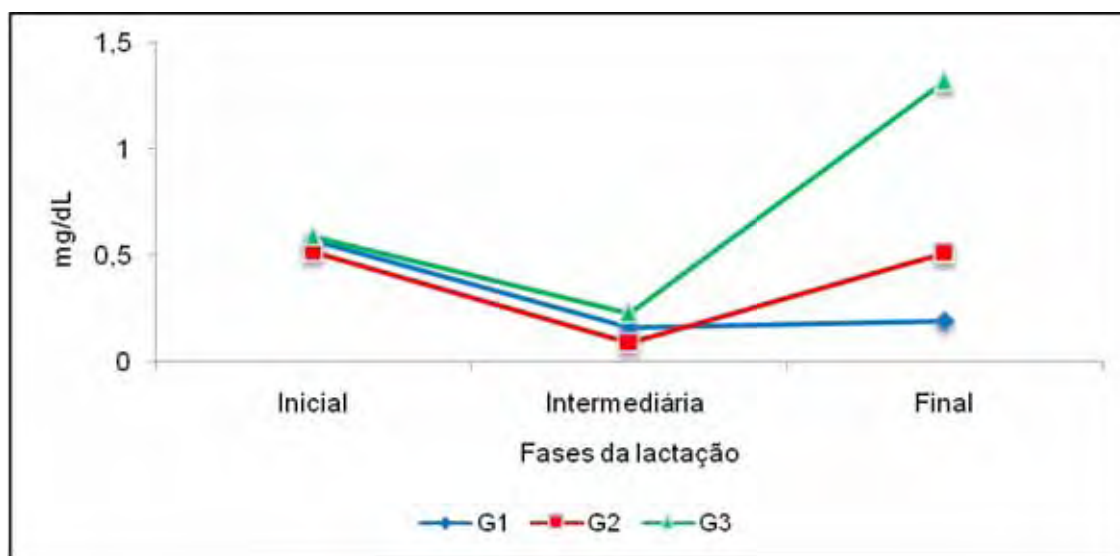


Figura 27. Variação da concentração de IgA (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9.2 Concentração de lactoferrina no soro lácteo

Foi observada queda da concentração de lactoferrina no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) entre a fase inicial e a fase intermediária, seguida por aumento nos níveis desta proteína na fase final da lactação. Os animais do G2 apresentaram os maiores valores da concentração de lactoferrina na fase final da lactação (Tabela 22 e Figura 28).

Newman et al., (2009) também observaram aumento da concentração de lactoferrina no período que antecede a secagem das vacas. Por outro lado, Sant'Ana (2004) não observou variação significativa da concentração de lactoferrina no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e pluríparas durante a lactação.

Rocha (2010) observou concentração de lactoferrina de 16,9 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e 14,1 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas 30 dias após o parto.

A lactoferrina exerce um importante papel na proteção da glândula mamária, uma vez que esta proteína sequestra o ferro tornando-o indisponível para os micro-organismos e dificultando o crescimento destes (NEWMAN, 2009).

Tabela 22. Médias e desvios padrão da concentração de lactoferrina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	26,7±10,1 ^{Aa}	26,6±7,85 ^{Aa}	38,0±13,8 ^{Aa}
G2	26,4±9,43 ^{Aa}	26,4±11,3 ^{Aa}	59,5±45,5 ^{ABb}
G3	31,7±21,4 ^{Aa}	24,9±7,80 ^{Aa}	55,4±28,3 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

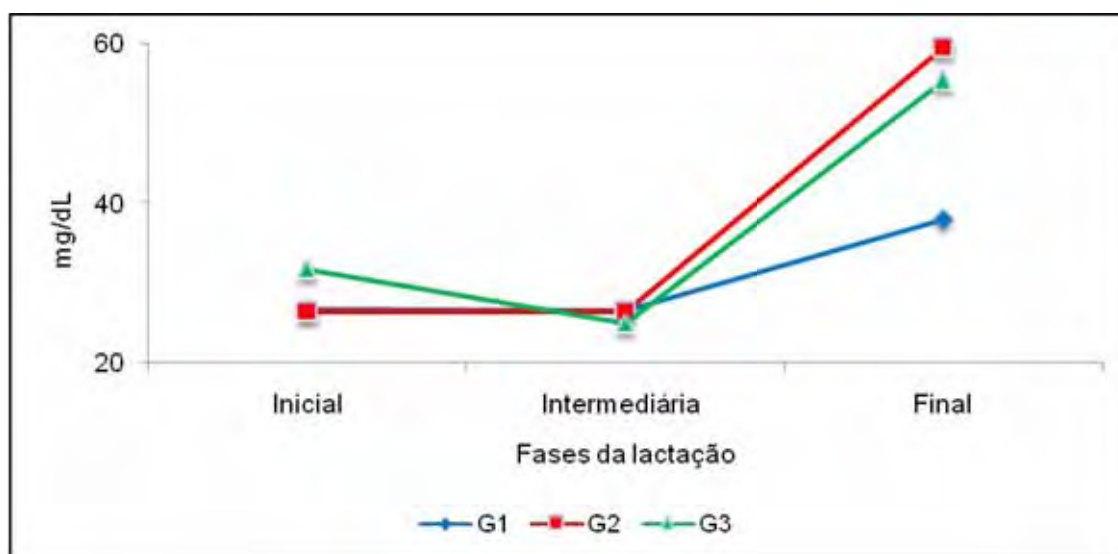


Figura 28. Variação da concentração de lactoferrina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9.3 Concentração de albumina sérica no soro lácteo

Foi observado aumento da concentração de albumina no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) da fase inicial para a fase final

da lactação, sendo significativo para os animais do G3. Os animais do G3 apresentaram a maior concentração de albumina sérica no soro lácteo na fase final da lactação (Tabela 23 e Figura 29).

Sant'Ana (2004) notou menor teor de albumina de origem plasmática no soro lácteo de vacas com duas a três lactações (61,7 mg/dL) em comparação com aquele de vacas primíparas (75,7 mg/dL) e pluríparas com quatro ou mais lactações (73,6 mg/dL).

A avaliação do teor desta proteína no soro lácteo pode ser um ótimo indicador de inflamação no úbere, pois sua concentração está aumentada durante o processo inflamatório devido ao aumento da permeabilidade vascular (SANT'ANA, 2006).

Assim, o aumento da concentração de albumina observado no final da lactação nos três grupos pode estar relacionado às alterações do tecido mamário provocados pelo processo de secagem da glândula mamária.

Rocha (2010) observou concentração de albumina sérica de 25,2 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e de 42,4 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 23. Médias e desvios padrão da concentração de albumina sérica (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	65,4±21,1 ^{Aa}	68,1±21,8 ^{Aa}	73,5±22,8 ^{Aa}
G2	67,6±23,6 ^{Aa}	73,1±26,4 ^{Aa}	95,8±55,3 ^{ABa}
G3	66,7±26,0 ^{Aa}	65,1±25,9 ^{Aa}	99,1±36,2 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

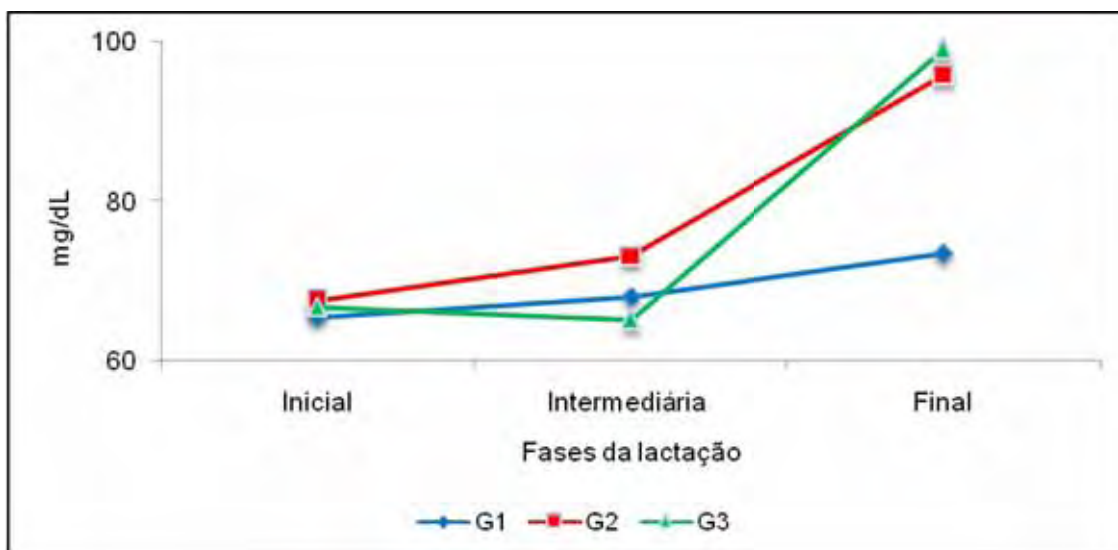


Figura 29. Variação da concentração de albumina sérica (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9.4 Concentração de imunoglobulina G (IgG) no soro lácteo

Foi observado queda da concentração de IgG no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) entre a fase inicial e intermediária da lactação seguida por aumento da concentração na fase final da lactação (Tabela 24 e Figura 30).

Sant'Ana (2004) verificou teores de IgG de 134 mg/dL, 117 mg/dL e 143 mg/dL no soro lácteo de bovinos de primeira lactação, de segunda ou terceira lactações e de quarta ou mais lactações, porém não verificou variações significativas da concentração de imunoglobulina G durante as fases da lactação.

A IgG tem grande importância no processo de transferência de imunidade passiva, sendo encontrados valores elevados desta imunoglobulina na fase colostrar (ROCHA, 2010), diminuindo rapidamente, atingindo valores mínimos no leite maduro (GEORGIEV, 2008).

Rocha (2010) observou concentração de IgG de 23,9 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e 34,2 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 24. Médias e desvios padrão da concentração de IgG (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações

(G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	24,4±69,8 ^{Aa}	15,4±8,55 ^{Ab}	19,9±10,2 ^{Ab}
G2	17,0±12,2 ^{Aa}	15,4±8,57 ^{Aa}	37,1±39,2 ^{Ab}
G3	25,4±33,7 ^{Aa}	20,6±14,0 ^{Aa}	49,7±54,7 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

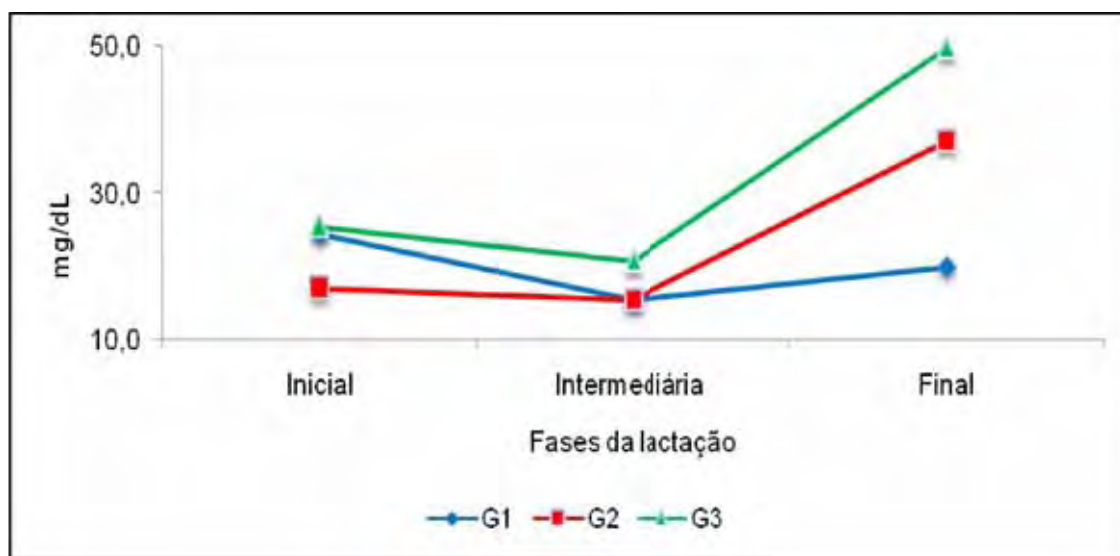


Figura 30. Variação da concentração de IgG (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9.5 Concentração β -lactoglobulina no soro lácteo

Houve redução da concentração de β -lactoglobulina no soro lácteo dos animais de todos os grupos entre a fase inicial e intermediária da lactação, seguida de aumento da concentração desta proteína na fase final da lactação para os animais do G1 e G3 e queda na concentração desta proteína para os animais do G2 na fase final da lactação (Tabela 25 e Figura 31).

Fraga et al. (2009) observou valores de 280, 260 e 150 mg/dL de β -lactoglobulina no soro lácteo de vacas Jersey nas fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente.

Rocha (2010) observou concentração β -lactoglobulina de 706 mg/dL no soro lácteo de fêmeas primíparas e de 872 mg/dL no soro lácteo de fêmeas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 25. Médias e desvios padrão da concentração de β -lactoglobulina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	971±224 ^{Aab}	850±147 ^{Aa}	925±111 ^{Aa}
G2	998±280 ^{Aa}	915±186 ^{Aa}	889±216 ^{Aa}
G3	1068±340 ^{Aab}	838±207 ^{Aa}	895±176 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

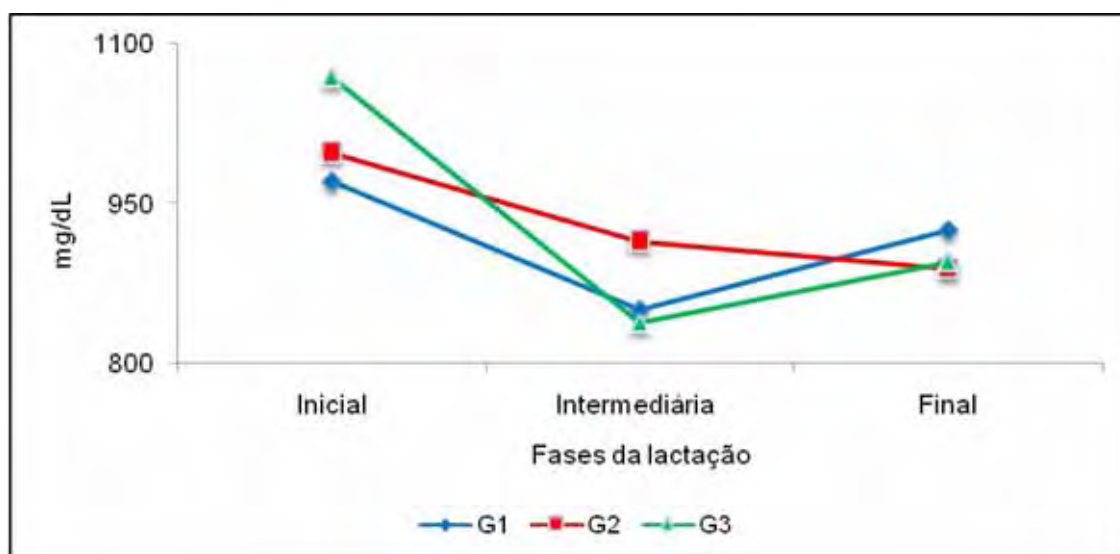


Figura 31. Variação da concentração de β -lactoglobulina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

5.9.6 Concentração α -lactoalbumina no soro lácteo

Foi observado aumento da concentração de α -lactoalbumina no soro lácteo das fêmeas primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) da fase inicial para a intermediária da lactação, seguido por aumento na concentração desta proteína para os animais do G1 e G3, sendo este aumento significativo para os animais do G1. Foi observado queda na concentração de α -lactoalbumina para os animais do G2 na fase final da lactação (Tabela 26 e Figura 32).

Sant'Ana (2004) observou menor valor médio de α -lactoalbumina no soro lácteo de vacas com duas a três lactações (135 mg/dL) e maior valor no soro lácteo de animais primíparos (150 mg/dL), porém não verificou alterações significativas da concentração desta proteína durante a lactação.

A redução do teor de α -lactoalbumina no final da lactação já foi descrita em bovinos e foi correlacionada com a queda na concentração de lactose que ocorre no final da lactação (FARRELL et al., 2004).

Rocha (2010) observou concentração β -lactoglobulina de 143 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas primíparas e 188 mg/dL no soro lácteo de fêmeas bovinas pluríparas 30 dias após o parto.

Tabela 26. Médias e desvios padrão da concentração de α -lactoalbumina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e fêmeas com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

Grupos	Fases da lactação		
	Inicial	Intermediária	Final
G1	312±198 ^{Aa}	387±169 ^{Ab}	458±74 ^{Ab}
G2	337±185 ^{Aa}	373±167 ^{Aa}	357±162 ^{Aa}
G3	326±202 ^{Aa}	427±132 ^{Aa}	436±140 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

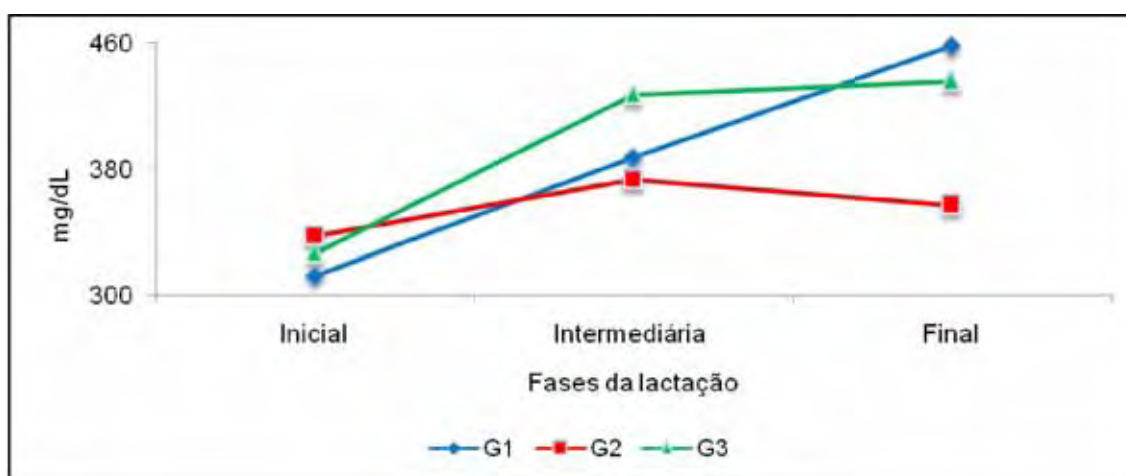


Figura 32. Variação da concentração de α -lactoalbumina (mg/dL) no soro lácteo de búfalas Murrah primíparas (G1), com duas a três lactações (G2) e com mais de três lactações (G3) durante a fase inicial, intermediária e final da lactação.

6. CONCLUSÃO

- A CCS no leite das búfalas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) aumentou ao longo da lactação, sendo mais elevada nas fêmeas com mais de três lactações (G3).

- Durante a lactação foi observado aumento das atividades das enzimas gamaglutamiltransferase e fosfatase alcalina, aumento das concentrações de proteína total, albumina, fósforo, magnésio, cloretos, sódio e redução das concentrações de cálcio total, ferro, cálcio ionizado e potássio.

- As fêmeas primíparas (G1) apresentaram maior atividade das enzimas gamaglutamiltransferase e fosfatase alcalina e maiores concentrações de fósforo e potássio. As fêmeas com duas a três lactações (G2) apresentaram maiores concentrações de proteína total, albumina, magnésio, cloretos, ferro e sódio. As fêmeas com mais de três lactações (G3) apresentaram maiores concentrações de cálcio total e cálcio ionizado.

- Durante a lactação foi observado aumento das concentrações de imunoglobulina A, lactoferrina, albumina sérica, imunoglobulina G, α -lactoalbumina e redução da concentração de β -lactoglobulina.

- As fêmeas primíparas (G1) apresentaram maior concentração de α -lactoalbumina. As fêmeas com duas a três lactações (G2) apresentaram maior concentração lactoferrina. As fêmeas com mais de três lactações (G3) apresentaram as maiores concentrações de imunoglobulina A, albumina sérica, imunoglobulina G e β -lactoglobulina.

- *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* sp. foram os micro-organismos mais isolados nas amostras de leite das búfalas Murrah durante a lactação, sendo *Staphylococcus* spp. mais predominante nas amostras de leite das fêmeas com uma lactação (G1), *Streptococcus* spp. nas

amostras de leite das fêmeas com duas a três lactações (G2) e *Corynebacterium* sp. nas amostras de leite das fêmeas com mais de três lactações (G3).

- Os antibióticos gentamicina, ceftiofur e cefoperazona apresentaram a maior eficiência *in vitro* e os antibióticos neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim apresentaram a menor eficiência *in vitro* contra os micro-organismos isolados nas amostras de leite das fêmeas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) ao longo da lactação. Foi observado multirresistência a três ou mais fármacos em 30,1% dos micro-organismos isolados.

- Não foi observada influência da pluviosidade na ocorrência de mastite nas búfalas Murrah primíparas (G1) e pluríparas (G2 e G3) ao de uma lactação completa.

7. REFERÊNCIAS

ALI, I.; MUHAMMAD, M.; ARSHAD, M.; SAQIB, M.; HASSAN, I. J. Bacteriology of mastitis in buffaloes in Tehsil Samundri of district Faisalabad, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 28, n. 1, p. 31-33, 2008.

ALI, L. Epidemiology of mastitis in dairy buffalo and cow in Tehsil Samundri of district Faisalabad. 2009. 252 f. Dissertation (Ph.D. in Physiology) - Faculty of Veterinary Medicine, University of Agriculture, Faisalabad, 2009.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; RITO, J. F. R.; SOUZA, G. N. Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Belo Horizonte, v. 59, n. 339, p. 37-41, 2004.

AMARAL, F. R. **Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas**. 2005. 46 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

ARNEY, D. R.; PHILIPS, C. J. The effects of changes in sodium and potassium concentration on the growth of mastitogenic bacteria in vitro. **The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Apopka, v. 3, n. 3, p. 242-248, 2005.

BADINI, K. B. **Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e dos hábitos de consumo do leite cru comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu/SP e São Manuel/SP**. 1995. 124 f. Dissertação

Mestrado em Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1995.

BASTOS, P. A. S.; BIRGEL, E. H. Leite de búfalas Murrah criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 6–13, 2011.

BAUMRUCKER, C. R.; POCIUS, P. A. Gamma-Glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat. **Journal of Dairy Science**, Champign, v. 61, n. 3, p. 309–314, 1978.

BAROZA, P. F. J. **Proteínas, enzimas e minerais na secreção láctea de cabras e vacas, nos primeiros 30 dias pós-parto, congelada ou não**. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

BATHIA, K. L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo milk. In: BUFFALO WORLD CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. v. 2. p. 162.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 3 293-298, 2007.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, I. M. **Current concepts of bovine mastitis**, 4th ed. Madison: National Mastitis Council. 1996. p. 33.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel.** Instrução Normativa nº 51. Brasília, 2002. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.** Instrução Normativa nº 62, Brasília, 2011. 24 p.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BURVENICH, C.; GUIDRY, A. J.; PAAPE, M. J. Natural defense mechanisms of the lactating and dry mammary gland. In: **INTERNATIONAL MASTITIS SEMINARS, IDF, 3.**, 1995, Israel. **Proceedings...** Israel: IDF, 1995. p. 3-13.

CARDOZO, R. M. Avaliação de testes para diagnóstico de mastites subclínicas em bovino de leite. **Revista Unimar**, Maringá, v. 18, n. 3, p. 627-636, 1996.

CARVALHO, L. B.; AMARAL, F. R.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

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

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. M. C.; Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Belo Horizonte, v. 57, n. 324, p. 8-10, 2002.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; MUNHOZ-BERROCAL, M.; JURADO-GAMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. n. 11, p. 2885-2889, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard** - 8th ed. CLSI document M2-A9. Wayne, PA, USA: 2006.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.

COSTA, E. O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; VEZON, P.; BARUSELLI, P. S.; PASKE, A. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds (*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira São Paulo, Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta, WORLD BUFFALO CONGRESS, 1997. p. 635-638.

COSTA, E. O. Controle e prevenção de mastite em bubalinos. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA , 1999. p. 68-73.

COSTA, E. O.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; GARINO JR, F.; HORIUTI, A. M.; BARUSELLI, P. S. Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica. **Napgama**, São Paulo, n. 1, p. 12-5, 2000.

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

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. A.; SILVA, K. P. C.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 17-21, 2006.

DINSMORE, R. P.; ENGLISH, P. B.; GONZALEZ, R. N.; SEARS, P. M.; SCHULTE, H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p.1521-1526, 1991.

DOREA, J. G. Iron and copper in human milk. **Nutrition**, New York, v. 16, p. 209-220, 2000.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.

FARRELL, H. M.; FLORES-JIMENEZ, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLER, C. M.; NG-KWAHANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FRAGA, R.; RAIMONDO, S.; MIYASHIRO, S. I.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência da fase da lactação nas proteínas do soro lácteo de vacas Jersey. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009. p. 732-738.

FERREIRA, N.; FREITAS FILHO, J. R.; LIMA, V. A. M. Redução do teor de caseína e albumina no leite de vacas da raça Girolanda. In: ZOOTEC, 2006, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: Associação Brasileira de Zootecistas, 2006. Disponível em: < www.abz.org.br/files.php?file=documentos/R0046_2_882800326.pdf > . Acesso em: 10 fev. 2013.

FREITAS FILHO, J. R.; FREITAS, W. R.; LIMA, R. S.; SILVA, M. S. J.; LIMA, R., T.; SOUZA, H. B.; LIMA, V. A. M. Avaliação do teor de caseína e albumina no leite de vacas da raça Girolanda. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 1, p. 42-48, 2009.

FERREIRA, L. M. **Variabilidade fenotípica e genotípica das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina.** 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

FERREIRA, J. L.; PAGATTO, C. P.; LINS, J. L. F. H. A.; AGUIAR FILHO, J. L. C.; CAVALCANTE, T. V. Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 14, 2010. Disponível em: <

<http://www.revista.inf.br/veterinaria14/artigos/RCEMV-AnoVIII-Edic14-Art08.pdf>> Acesso em: 02 fev. 2013.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Editorial Lemos, 2000. 175 p.

FOX, P. F.; KELLY, A. L.; Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 2. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 517-532, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>.> Acesso em: 10 fev. 2013.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, Salerno, n. 4, p.26-27, 2000.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, Aberdeen, v. 45, n. 4, p. 473-483, 2005.

GEORGIEV, I. P. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 11, n. 1, p. 3-12, 2008.

GÓRSKA. A.; OPRZADEK, K. Concentration of trace elements in raw milk depending on the lactation period and age of cows. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 80, n. 2, p. 203-206, 2011.

HAMZA, P. A.; CHOUDHURI, P. C. Chemoprophylactic studies on mastitis in buffaloes. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 47, n. 9, p. 723-726, 1994.

HARMON, R. J.; RENEAU, J. K. **Fatores que afetam a contagem de células somáticas no leite**. Curitiba: Altech do Brasil, 1993.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HEJTMÁNKOVÁ, A.; PIVEC, V.; TRNKOVÁ, E.; DRAGOUNOVÁ, H. Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 57, n. 7, p. 323-331, 2012.

HILLIER, R. M. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide-gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 43, n. 2, p. 259-65, 1976.

HOFFMANN, W. E.; SOLTER, P. F. Diagnostic enzymology of domestic animals. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press. 2008. cap. 12, p. 351-378.

IDF. International Dairy Federation. **Bovine mastitis: definition and guidelines for diagnosis**. Boletim do IDF. Bruxelas, 1987. 24 p.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. CASSIA.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KAPRONEZAI, J. **Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Análise microbiológica, teste de Tamis e *California Mastitis Test* realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 179-83, 2005.

KATO, K.; MORI, K.; KATOH, N. Different protein patterns in normal and mastitic milks as revealed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. [Japanese Journal of Veterinary Science](#), Tokyo, v. 51, n. 6, p. 1275-8, 1989.

KENNY, A. J. . g-Glutamyl transferase (g-glutamyl transpeptidase). In BARRETT, A. J. (Ed.), **Proteinases in mammalian cells and tissues**. Amsterdam, The Netherlands: North-Holland. 1977. p. 410–417

KOCINA, I.; ANTANE, V.; LUSIS, I. The concentration of immunoglobulins A, G, and M in cow milk and blood in relation with cow seasonal keeping and pathogens presence in the udder. **The latvia University of Agricultura**, Jelgava, v. 27, n. 1 p. 44-53, 2012.

KUME, S.; TANABE, S. Effect of parity on colostral mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 6, p. 1654-1660, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, London**, v. 458, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAM, T. J. G. M.; van WUIJCKHUISE, L .A.; FRANKEN, P.; MORSELT, M. L.; HARTMAN, E. G.; SCHUKKEN, Y. H. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 208, n. 10, p. 1705-1708, 1996.

LARSON, B. L. Biosynthesis and secretion of milk proteins. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 161-74, 1979.

LAU, H. D. Import diseases buffalo. In: BUFFALO WORLD CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo:Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. v.2. p.168.

LEITNER, G., MERIN, U., SILANIKOVE, N. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters. Comparison among cows, goats and sheep. **International Dairy Journal**, Amsterdam , v. 21, p. 279–285, 2011.

LITWINCZUK, Z.; KROL, J.; BRODZIAK, A.; BARLOWSKA, J. Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 684-691, 2011.

LINZELL, J. L.; PEAKER, M. Mechanism of milk secretion. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 51, v. 3, p. 564–597, 1971.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.

MADELLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; ADONA, P. R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 1, p. 53-54, 2005.

MARTINS FILHO, L. P. **Inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (Estirpe ATCC 25923) em vacas leiteiras: estudo clínico, laboratorial e terapêutico.** 2006. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica

Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

MARTINS, R. P.; SILDA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MEDEIROS, E. S.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SAUKAS, T. N.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; MOTA, R. A. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 219-223, 2011.

MONARDES, H. Somatic cell counting and genetic improvement of resistance to mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 1994. p. 1-19.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. O.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press. 2 v., 2007. 1035p

NEWMAN, K. A.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; LAKRITZ, J.; DEGRAVES, F. J. Lactoferrin concentrations in bovine milk prior to dry-off. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 76, n. 4, 2009.

O'ROURKE, D. J.; BLOWEY, R. W. Cell counts and mastitis monitoring. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. (Eds). **Bovine medicine: Diseases and husbandry of cattle**. Oxford: Blackwell, 1992. p. 305–312.

OSMAN, K. M.; EL-ENBAAWY, M. I.; EZZELDEEN, N. A.; HUSSEIN, H. M. G. Mastitis in dairy buffalo and cattle in Egypt due to *Clostridium perfringens*:

prevalence, incidence, risk factors and costs. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, Paris, v. 28, n. 3, p. 975-986, 2009.

PARDO, R. B. **Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite**. 2007. 113 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

PETROVA, N.; TZANKOVA, M. SCC on milk from tree breeds of buffaloes in Shoumen Region. **Bulgarian Journal of Agriculture Science**, Stara Zagora, v. 5, n. 6, p. 895-900, 1999.

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

PRASAD, R. V.; RATHMAN, K.; SHAH, D. G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira district, India. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 49, n. 1, p. 441-447, 1996.

PUHAN, Z.; URECH, E.; SCHALLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, [Champaign](#), v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PETRO, R. C. L.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 132-138 2012.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed: Porto Alegre, 2005. 512 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. (Eds). **Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 673–762.

RANGEL, A. H. N.; OLIVEIRA, J. P. F. O.; ARAÚJO, V. M.; BEZERRA, K. C.; MEDEIROS, H. R.; LIMA JUNIOR, D. M.; ARAUJO, C. G. F. Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfalas. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 3, p. 306- 310, 2011.

RAIMONDO, R. F. S.; MIYASHIRO, S. I.; MORI, S. C.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 119-125, 2013.

RENEAU, J. K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **Journal of Dairy Science**, [Champaign](#), v. 69, n. 6, p. 1708-1720, 1986.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S. F. (Eds). **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 759-771.

SANTANA, A. M. **Infecção experimental com *Salmonella* Dublin em bezerros bubalinos: estudo clínico, laboratorial e terapêutico**. 2012. 156 f. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H. Obtenção do soro lácteo para o fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 9., CONGRESSO

BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA. 3., 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p. 31.

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade**. 2004. 161 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H.; ROSENFELD, A. M. F.; SOARES, P. C. Proteinograma de vacas lactentes submetidas a retenção láctea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 262-269, 2006.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H.; ROSENFELD, A. M. F.; SOARES, P. C. Proteinograma do leite de vacas lactentes submetidas à retenção láctea. [Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science](#), São Paulo, v. 42, n. 2, p. 262-269, 2006.

SHAMAY, A.; HOMANS, R.; FUERMAN, Y.; LEVIN, I.; BARASH, H.; SILANIKOVE, N.; MABJEESH, S. J. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 2, n. 88, p. 569-576, 2005.

SHENNAN; D. B, PEAKER, M. Transport of milk constituents by the mammary gland. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 80, n. 3, p.925-951, 2000.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**, Philadelphia: Lea and Febiger, 1971. 360 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.

SILVA, D. G. **Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin**. 2007. 186f. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

SINGH, S. P.; SINGH, R. S. Influence of somatic cell count on the physico-chemical properties of buffalo Milk. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 34, n.1, p. 96-97, 1981.

SINGH, M.; LUDRI, R. S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-gu, v. 14, n. 12, p. 189-192, 2001.

SMITH, K. L. **A discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell count and clinical mastitis**. Brussels: International Dairy Federation: IDF, 2002. 144 p. (IDF. Bulletin, 372).

STEFFERT, I. J. Compositional changes in cow's milk associated with health problem. In: MILK FAT FAVOUR FORUM, New Zealand.. **Proceedings...** New Zealand: New Zealand Dairy Research Institute, 1993. p. 119-125.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 175-182.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 269-276.

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 696 p.

TRIPALDI, C.; TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, S.; ANGELUCCI, M.; DANESE, V. The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo Milk. **Asian Australian Journal Animal Science**, Gwanak-gu, v. 16, n. 5, p. 738-742, 2003.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, G. T.; ZAMBOM. M. A.; RIBAS, N. P.; MULLER, E. E.; DAMASCENO, J. C.; ÍTAVO, L. C. V.; VEIGA, D. R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

ZAFALON, L. F., NADER FILHO, A., OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mamite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L. BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 15, n. 1, p. 56-65, 2008

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; VESCHI, J. L. A. Contagem de células somáticas no leite de vacas de diferentes raças em distintas lactações e condições climáticas. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 378-385, 2010.