

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTEÚDO CELULAR DO LEITE BUBALINO
PROVENIENTE DE QUARTOS MAMÁRIOS SADIOS E
PORTADORES DE MASTITE**

Renata Bonini Pardo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTEÚDO CELULAR DO LEITE BUBALINO PROVENIENTE
DE QUARTOS MAMÁRIOS SADIOS E PORTADORES DE
MASTITE**

Renata Bonini Pardo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2007

P226c Pardo, Renata Bonini
Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos
mamários sadios e portadores de mastite / Renata Bonini Pardo. --
Jaboticabal, 2007
xiii, 80 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Antônio Nader Filho
Banca examinadora: Hélio Langoni, Nilson Roberti Benites,
Humberto Tonhati, Luiz Augusto Amaral
Bibliografia

1. búfalas. 2. contagem de células somáticas transformada. 3.
mastite subclínica. 4. *Corynebacterium* spp.. I. Título. II. Jaboticabal -
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.19-002:636.292

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATA BONINI PARDO - nascida em Osvaldo Cruz, em 20 de junho de 1971. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de Marília no ano de 1994. Participou no Núcleo de Pesquisa em Mastite e Produção Leiteira do curso de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo entre 1993 e 1994, quando recebeu Bolsa de iniciação Científica do CNPq, sob orientação da Profa. Dra. Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães. Recebeu o título de Mestre em Vigilância Sanitária pela Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, no ano de 1998, com o trabalho intitulado “Isolamento de Mycobacterium spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para Tuberculose, segundo o teste de Stormont”, sob orientação do Prof. Dr. Hélio Langoni, quando recebeu Bolsa de mestrado da FAPESP. Desde 1998 já exerceu cargo de Professora nas disciplinas de Microbiologia Veterinária, Epidemiologia Veterinária, Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública e Higiene e Inspeção dos Alimentos de Origem Animal, nos cursos de Medicina Veterinária da Universidade Norte do Paraná (1998-1999) e da Universidade de Marília (2000-2006). Atualmente é Professora do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas de Ourinhos, nas disciplinas de Metodologia Científica e Epidemiologia Veterinária; e no Curso de Tecnologia em Alimentos da Faculdade de Tecnologia (FATEC) em Marília/SP, nas disciplinas de Epidemiologia e Tecnologia de Leite. Em cada uma das Instituições onde trabalhou e onde trabalha, coordenou e coordena grupos de estudos de graduandos voltados para realização de trabalhos de pesquisa de iniciação científica e educação em saúde pública na prevenção de zoonoses veiculadas por alimentos, com particular referência ao leite.

“Nenhum vento sopra a favor de quem não sabe para onde ir. Quando temos um objetivo claro, o Universo inteiro conspira silenciosamente em nosso favor.”
(Hammed)

Dedico este trabalho,

A todos aqueles que dele se aproveitarem para transformar as idéias em atitudes, os
medos em crescimento, os números em amigos, as dúvidas em conhecimento, o
conhecimento em vida e a vida em uma nova e melhor realidade.

Agradeço

A Deus por todas as vezes em que, ao buscar as respostas para minhas descrenças, me vejo caminhando sobre meus próprios passos, percebendo em minha alma muitas de suas palavras.

Aos meus pais, Maier e Santana, e meus irmãos, Júlio César, Victor Hugo e Márcia, por estarem sempre ao meu lado suportando todas as dificuldades e as dúvidas que acompanham o crescimento, lembrando-me que a menor das sementes guarda em si mesma toda a força e grandeza da árvore em que vai se tornar. Basta persistir e confiar.

Ao Prof. Dr. Antonio Nader Filho pela oportunidade de tantas realizações e descobertas, ora recheada de suas indagações, ora de suas sugestões. Acima de tudo, agradeço por todas as vezes em que, junto de um sorriso ou de um voto de confiança, transformou o “não” em “sim”. Obrigada por me acompanhar e me orientar nesta fase da jornada, reconhecendo minhas intenções no meio de todas as minhas correrias.

À Sra. Fátima Cavaliere e ao Sr. Luiz Antônio Colussi que, sem restrições, abriram as portas de sua propriedade para alguém que nunca haviam visto na frente. A vocês agradeço a fundamental contribuição para transformar hipóteses em conhecimento e amizade. Minha retribuição para tanta confiança? São muitas porque poderão contar sempre com minha gratidão, todas as minhas dúvidas e com uma única certeza que é a minha vontade de superar obstáculos na busca das respostas.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni pelas idéias trocadas, sugestões oferecidas e análises realizadas, que contribuíram para a realização deste projeto. Obrigada por ter me ensinado a ser Professora e por me lembrar sempre que o bom mestre é aquele que leva seus discípulos no coração, para todo lugar em que vai.

À Carla Maria Brás Bittencourt por ser a doce e firme voz que continua ensinando meu coração falar à minha razão para seguir em frente.

Ao pós-graduando Geovanny Mendoza Sánchez, que chegou à última hora, mas que alcançou minha admiração e confiança por não medir esforços para transformar

mirabolantes idéias em realidade através de fórmulas, paciência e amizade. Obrigada pela ajuda em reconhecer meus limites e avançar sobre eles.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati por ter contribuído para o enriquecimento dos objetivos e das conclusões deste projeto, transformando o mesmo em ponto de partida para novos trabalhos.

Ao meu eterno ex-aluno e pós-graduando Luciano Menezes Ferreira, às pos-graduandas Viviane de Souza e Poliana Melo por todos os abraços, por todo estímulo e por toda conversa mineira na hora em que o estresse e o medo do desconhecido tomaram conta do coração.

Às pós-graduandas Fabiana Christovão Garcia, Natália Nespolo e Vanessa Páfaro pelo abrigo, pelas conversas, pelos conselhos e pela amizade que se construiu e se fortaleceu.

Aos meus ex-alunos Eliata B.S. Ferreira, Danilo L. Ravena, Gilson Antônio Berto, Vitor Comino, Lucas Comino, Ricardo V. Salioni, Marcos Emerenciano D. Rocha e Renata Pagoti Maia por todas as madrugadas e por todos os finais de semana em que passaram ao meu lado preparando o material, coletando as amostras e processando e identificando as bactérias.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral pela atenção em todos os domingos que o procurei para aprender a fazer médias geométricas e aritméticas pelo telefone e pelas idéias acrescidas durante a qualificação. Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior pela crítica firme e construtiva. À Profa. Dra. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho e ao Prof. Dr. Raul José Silva Girio pelas correções e considerações durante a qualificação deste projeto. Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata pelos conhecimentos passados com tanta dedicação à respeito da Ciência do Leite. À Maria Aparecida Dias Tostes Figueira por responder sempre prontamente a toda dúvida de última hora. Ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias pelas orientações epidemiológicas. Ao “Diba”, Waldemar Dibelli Júnior, pelo sorriso, pelo respeito e pelas boas novas ditas em segredo que me serviram para renovação em momentos de grande afobação. À “Lila” Liliana Biondi Naka também agradeço pelos elogios na hora certa. Agradeço à Mariza Bonafim Borges Lemos pela atenção a cada solicitação apressada.

Ao Prof. Dr. Nilson Roberti Benites pelas orientações que ofereceu sobre a contagem diferencial das células somáticas na fase de elaboração deste projeto. Ainda que desta vez não tenham sido colocadas em prática, serviram para o planejamento da outra fase que se seguirá à esta.

Aos Professores do Curso de Tecnologia em Alimentos da Faculdade de Tecnologia (FATEC) em Marília, nomeados: Profa. Dra. Marie Oshiiwa, Profa. MSc. Flávia Farinazzi Machado, Profa. Dra. Cláudia Mendonça, Profa. Dra. Alice Yoshiko Tanaka, Profa. Dra. Cláudia Dorta, Profa. MSc. Anna Cláudia Sahade, Prof. MSc. Paulo Marinelli e Profa. Dra. Rogéria Duarte. Ao Prof. Dr. Domingos José Sturion, coordenador do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO). A todos eles agradeço por entenderem minhas necessidades e por me surpreenderem em todas as oportunidades com a cordialidade, o respeito, a honestidade e a sinceridade que podem existir e ser compartilhadas no ambiente de trabalho, estimulando a lealdade.

E às pessoas que, num passado bem próximo, me lançaram à oportunidade de encontrar todos esses novos amigos, toda essa nova realidade e todos esses novos sentimentos que sempre existiram atrás dos muros que costumavam ser o limite dos meus sonhos.

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
III. OBJETIVOS.....	29
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
V. RESULTADOS.....	38
VI. DISCUSSÃO.....	60
VII. CONCLUSÕES.....	70
VI. REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO.....	87

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Página
Tabela 1. Porcentagens de amostras de leite positivas e negativas ao CMT na análise dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	39
Tabela 2. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	40
Tabela 3. Porcentagens de amostras de leite com resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	40
Tabela 4. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	41
Tabela 5. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	42
Tabela 6. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	43

Tabela 7. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	44
Tabela 8. Porcentagens dos 276 isolados de <i>Corynebacterium</i> spp. conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	45
Tabela 9. Porcentagens dos 97 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativos conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	45
Tabela 10. Porcentagens dos 41 isolados de <i>Micrococcus</i> spp. conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	46
Tabela 11. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	46

Tabela 12. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios entre as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	47
Tabela 13. Médias, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	48
Tabela 14. Médias, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios durante as fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	48
Tabela 15. Médias, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	48
Tabela 16. Distribuição, em porcentagem, das diferentes intensidades de reação (1+, 2+ e 3+) dos 147 resultados positivos do CMT de acordo com a confirmação microbiológica em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	50
Tabela 17. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT em amostras analisadas nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	52

Tabela 18. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT em amostras analisadas nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	54
Tabela 19. Médias, desvios padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras coletadas de quartos mamários positivos e negativos ao CMT entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	55
Tabela 20. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras positivas ao CMT em diferentes intensidades de reação coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	56
Tabela 21. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras coletadas de quartos mamários positivos e negativos ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	56
Tabela 22. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras positivas ao CMT em diferentes intensidades de reação, coletadas de quartos mamários na época das águas e da seca (Jaboticabal, 2007).....	57

Tabela 23. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras positivas e negativas ao exame microbiológico, coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	57
Tabela 24. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras contendo crescimentos puros de <i>Corynebacterium</i> spp., SCN e <i>Micrococcus</i> spp., coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	58
Tabela 25. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras microbiologicamente positivas e negativas coletadas de quartos mamários clinicamente saudáveis nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	58
Tabela 26. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras microbiologicamente positivas e negativas coletadas de quartos mamários clinicamente saudáveis nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	59

Tabela 27. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras com resultados positivos e negativos ao CMT e ao exame microbiológico, em amostras coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	68
Quadro 1. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007)	49
Quadro 2. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 179 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase inicial de lactação (Jaboticabal, 2007).....	51
Quadro 3. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 332 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase média de lactação (Jaboticabal, 2007).....	51
Quadro 4. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 196 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	51
Quadro 5. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 478 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na estação de seca (Jaboticabal, 2007).....	53

Quadro 6. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 229 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na estação de águas (Jaboticabal, 2007).....	53
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Porcentagens dos resultados positivos e negativos do <i>California Mastitis Test</i> (CMT) observados no leite de 735 quartos mamários de fêmeas bubalinas analisados no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	38
Figura 2. Porcentagens dos 227 resultados positivos do CMT distribuídos de acordo com a intensidade das reações (1+, 2+ e 3+) encontradas na análise do leite dos quartos mamários de búfalas leiteiras no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	39
Figura 3. Porcentagens dos resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise do leite dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	39
Figura 4. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	40
Figura 5. Porcentagens dos resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise do leite dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	41
Figura 6. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	41
Figura 7. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos	

exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	42
Figura 8. Percentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).....	43
Figura 9. Percentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	43
Figura 10. Distribuição, em porcentagem, dos resultados microbiológicos positivos e negativos entre as 219 amostras de leite positivas e as 488 amostras negativas ao CMT coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	49
Figura 11. Distribuição, em porcentagem, das diferentes intensidades de reação (1+, 2+ e 3+) dos 147 resultados positivos do CMT, de acordo com a confirmação microbiológica em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).....	50
Figura 12. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite positivas (+) ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	51

Figura 13. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite negativas (-) ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	52
Figura 14. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT, em amostras de leite analisadas nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).....	53
Figura 15. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite positivas (+) ao CMT nas estações do ano de seca e de águas.....	54
Figura 16. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite negativas (-) ao CMT nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	54
Figura 17. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT em amostras de leite analisadas nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).....	55

CONTEÚDO CELULAR DO LEITE BUBALINO PROVENIENTE DE QUARTOS MAMÁRIOS SADIOS E PORTADORES DE MASTITE

RESUMO - Os exames de palpação, inspeção e teste da caneca de fundo escuro, bem como o *California Mastitis Test* (CMT) foram realizados em 735 quartos mamários de búfalas leiteiras pesquisa de alterações clínicas e subclínicas nos quartos e em suas respectivas secreções. Independentemente dos resultados encontrados, foram coletadas amostras de leite para análises microbiológicas e de contagem de células somáticas (CCS). O isolamento microbiológico foi realizado em ágar sangue de ovino 5% e em ágar MacConkey, com 72 horas de incubação em aerobiose a 37°C. Foram procedidas, a cada 24 horas, leitura e identificação dos isolamentos. A ocorrência de quadros de mastite clínica foi representada por um único caso (0,14%) entre os 735 quartos mamários analisados, ocorrendo na fase inicial da lactação e envolvendo microrganismos de origem ambiental (*Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*). Foram considerados quadros de mastite subclínica aqueles com resultados positivos ao CMT acompanhados de exame microbiológico positivo. A frequência observada de quadros de mastite subclínica entre os 734 quartos mamários estudados foi de 20,03%, dos quais isolou-se principalmente microrganismos contagiosos. Os resultados negativos ao CMT predominaram durante todo o estudo (69,07%), independente da fase de lactação ou estação do ano consideradas, tendo sido observados resultados positivos do exame microbiológico em 57,58% das amostras CMT negativas. Foi elevada a frequência de microrganismos classificados como contagiosos entre as amostras de leite analisadas, independente da estação do ano e da fase de lactação, entre os quais prevaleceu o *Corynebacterium* spp. (47,67%), entre os 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros bacterianos crescidos em cultura pura ou em associação. Considerando-se a falta de homogeneidade entre as variâncias, as contagens de células somáticas foram submetidas à transformação logarítmica $\log_2(\text{CCS}/100)+3$, dando origem à contagem de células somáticas transformada (CCST). As médias de CCST apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de leite positivas (2,23) e negativas (1,71) ao CMT, o

mesmo acontecendo entre as amostras positivas (1,92) e negativas (1,79) ao exame microbiológico. Nas amostras negativas ao CMT, a CCST média das amostras com exame microbiológico positivo (1,77) foi significativamente maior que a média daquelas com ausência de isolamento (1,64). No entanto, a ausência de reação ao CMT pode ser justificada pelo fato dela ter sido inferior à média da CCST das amostras portadoras de mastite subclínica (2,22). De acordo com as observações do presente estudo, a limitação mais importante do CMT como método de diagnóstico de mastite subclínica em búfalas esteve relacionada aos quartos não reagentes ao CMT, mas com isolamento microbiano positivo, que poderiam representar fontes de infecção não identificadas.

Palavras-chave: búfalas, contagem de células somáticas transformada, mastite subclínica, *Corynebacterium* spp.

CELL CONTENT IN MILK FROM HEALTHY AND MASTITIC MAMMARY QUARTERS FROM BUFFALO COWS

SUMMARY – A total of 735 mammary quarters from buffalo cows were submitted to inspection, palpation, strip cup test and California Mastitis Test (CMT) in order to diagnose clinical and subclinical mastitis. Independent of the observed results, milk samples were collected from each mammary quarter to microbiological exams and automatic somatic cell counts (SSC). Milk samples were inoculated in 5% ovine blood agar and MacConkey agar and incubated for 72 hours under 37°C and aerobic condition. Growth observations and identifications were performed every 24 hours. One (0,14%) out of 735 mammary quarters studied presented clinical mastitis. It occurred in first stage of lactation (0 to 60th day post calving) and environmental microorganisms were isolated (*Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*). Mammary quarters presenting positive results to CMT and microbiological exams were considered as subclinical mastitis cases and these represented 20,03% among 734 studied samples. CMT negative results were the most frequent observed during the study (69,07%), independent of lactation stage or season of the year considered. Among these CMT negative milk samples, 57,58% were positive in microbiological exams. There was a high occurrence of contagious microorganisms among the 579 identified bacteria from 19 different genus, isolated in pure or in association. *Corynebacterium* spp. was the most prevalent (47,67%), in every lactation stage or season of the year. Considering the absence of a normal distribution, somatic cell counts were submitted to a logarithmic transformation, $\log_2(\text{CCS}/100)+3$, originating the transformed somatic cell count (TSSC). There were statistically significant differences between TCCS means from milk samples with positive (2,23) and negative (1,71) results to CMT. Such differences were also observed in milk samples positive (1,92) and negative (1,79) to microbiological exams. Considering CMT negative samples, the TSSC mean observed in microbiological positive milk samples was significantly higher (1,77) than that observed in microbiological negative ones (1,64). Nevertheless, the absence of CMT reactions in such microbiological positive samples may be related to the fact that this mean was

lower than the TSSC mean observed in subclinical mastitis milk samples (2,22). According to the results observed in the present study, the most important restriction observed in the use of CMT as an auxiliary method to diagnose subclinical mastitis in buffalo cows was related to the occurrence of positive microbiological results in CMT negative quarters, which represented non identified infection sources that remained among healthy producing quarters.

Keywords: buffalo cows, transformed somatic cell count, subclinical mastitis, *Corynebacterium* spp.

I. INTRODUÇÃO

Até a década de 90, o leite bubalino era comercializado misturado ao leite bovino nas usinas de laticínios. Atualmente, a exemplo do que acontece na Itália e nos países asiáticos, existem as pequenas indústrias de laticínios que processam exclusivamente leite de búfala, muitas vezes situadas na propriedade ou em forma de cooperativas. Os derivados produzidos são muçarela, queijo tipo frescal, doce de leite, requeijão, provolone, ricota, iogurte, requeijão, sorvetes, manteiga, leite fermentado, etc. com uma grande vantagem para a indústria, visto que, em função de uma composição toda especial do leite bubalino, este apresenta um rendimento 40 a 50% maior que o leite bovino (DERIVADOS, 2007; CUNHA NETO, 2005; AMARAL et al., 2003).

Conquanto as características físico-químicas garantam ao leite de búfala inúmeras vantagens sobre o leite bovino, é fundamental não desconsiderar que estas características são igualmente suscetíveis à falta de qualidade nos processos de obtenção e de manutenção que antecedem a manipulação industrial desta matéria-prima (RAMOS & SILVA, 1997).

Sabendo-se que a mastite, clínica ou subclínica, *per se* determina alterações anatômicas e funcionais da glândula mamária e compromete a composição físico-química, quando não microbiológica, do leite secretado, os padrões sanitários de manejo de ordenha são de grande relevância por favorecerem diretamente a interação agente etiológico-hospedeiro.

Nesse sentido, à semelhança do que acontece na bovinocultura leiteira, a contagem de células somáticas nos quartos mamários em lactação pode mostrar-se como a primeira ferramenta para a determinação de um produto final de qualidade e de segurança, uma vez que são reconhecidas sua relação direta com os casos de infecção da glândula mamária; e sua implicação indireta sobre o comprometimento industrial do leite, a “vida de prateleira” dos derivados e, principalmente, a possível veiculação de agentes zoonóticos ou de suas toxinas ao consumidor.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A classificação zoológica dos búfalos domésticos os coloca dentro da família *Bovidae* e subfamília *Bovinae*. Dentro da subfamília podem ser encontrados os gêneros *Bos* (boi verdadeiro), *Bison* (bisão americano), *Synceros* (búfalo africano ou selvagem) e *Bubalus* (búfalos asiáticos). Este último gênero conta com três variedades: *fulvus*, *kerabao* e *bubalis* (AMORIM JÚNIOR et al., 2002).

Originado na Ásia, o *Bubalus bubalis* foi levado para África, introduzido na Europa e finalmente chegou ao continente americano, onde o maior rebanho é encontrado no Brasil (DAMÉ, 2007). No Brasil, a história dos búfalos teve início por volta de 1895 na Ilha de Marajó, Estado do Pará. Antes e após a primeira Guerra Mundial, foram feitas diversas introduções de alguns exemplares de búfalos da raça Murrah e Jaffarabadi, que posteriormente se espalharam por todo território nacional (VALE, 1999).

Atualmente, no Brasil são criadas quatro raças de bubalinos: Murrah, Jaffarabad, Carabao e Mediterrâneo, sendo a última de origem Européia (Itália). De acordo com estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, o rebanho nacional atinge cerca de 3,5 milhões de cabeças (BASTIANETTO, 2005). Dados oficiais do IBGE (2007), entretanto, citam quase 1,174 milhão de cabeças no ano de 2005, dos quais aproximadamente 62% encontram-se na Região Norte, com 728 mil, seguindo-se a Região Sul onde existem 144 mil animais, os 121 mil búfalos da Região Nordeste, o Sudeste com 113 mil e, finalmente, a Região Centro-Oeste que alberga 65 mil bubalinos. Na região Sudeste, o Estado de São Paulo concentra o maior rebanho com 71 mil animais, posicionando-se como o quinto colocado no país, acompanhado por Minas Gerais (36 mil cabeças), Rio de Janeiro (5 mil cabeças) e Espírito Santo (600 cabeças).

O búfalo foi considerado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação) como o animal doméstico mais dócil do planeta. Trata-se, ainda, de um excelente conversor de forragens de reduzido valor nutritivo, transformando-a, com maior eficiência que os bovinos, em matéria-prima de destacada qualidade.

Apresentam elevada capacidade de adaptação, produzindo carne, leite e trabalho ao redor do mundo, em todas as latitudes, longitudes, altitudes e condições climáticas. Todavia, sua melhor produtividade é obtida quando são colocados em áreas de terra firme, com água apenas para beber e disponibilidade de áreas sombreadas para regulação térmica, apesar de terem sido originalmente criados e adaptados às áreas alagadas. Em tais condições, é notável a longevidade de trabalho do búfalo, havendo relato na Ásia de animais que continuam a trabalhar com idade de 30 até 40 anos. Com todas essas características positivas, nos últimos anos essa espécie animal tem se constituído em importante fonte alternativa de produção de carne, leite e tração, principalmente para suprir as demandas dos países em desenvolvimento (BARUSELLI, 1999; DERIVADOS, 2007).

O continente asiático é responsável por 96% da produção mundial de leite de búfala. Em 1999, o volume de produção calculado nesse continente foi de 57,35 bilhões de litros e, desse montante, 92,12% foram produzidos na Índia, China e Paquistão, que possuem aproximadamente 78% da população mundial de búfalos. Na Índia, o primeiro produtor mundial de leite bubalino, cerca de 55% do volume total de leite é de origem bubalina. No Paquistão, segundo maior produtor mundial, o leite de búfala representa mais de 75% de todo o leite produzido no país (SILVA et al., 2003).

No Brasil, o volume médio de leite bubalino produzido diariamente é de 100 mil litros. Essa atividade agropecuária depende, em mais de 80%, da produção na pequena propriedade, de base familiar. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, os pequenos criadores (com rebanho entre dez e 50 cabeças) representam 70% dos criatórios (DAMÉ, 2007). À semelhança dos países asiáticos, uma das funções mais importantes dos bubalinos brasileiros é, sem dúvida, a produção de leite.

Para comprovar que o volume e a composição do leite são sensíveis a todo tipo de alteração sanitária ou zootécnica, que caracteriza o manejo leiteiro, alguns autores delinearam estudos para demonstrar influências positivas e negativas da raça, da composição do alimento oferecido, da higiene de ordenha e mesmo do método de

oferta deste alimento (TZANKOVA & PETROVA, 2000; VIANNI et al., 2000; FRANCIA et al., 2003; SALIMEI et al., 2005). Contudo, é a mastite uma das mais complexas e onerosas enfermidades que acometem o rebanho destinado à produção leiteira, determinando grandes perdas econômicas também no laticínio, perdas essas decorrentes da composição alterada do leite utilizado para a fabricação dos subprodutos (HARMON, 1994; BARBERIO et al., 1999; TONHATI, 1999).

JORGE et al. (2005) não encontraram significativa correlação entre CCS e produção leiteira e MORONI et al. (2006) não consideraram significativas as perdas observadas nos animais com infecção intramamária. Em seu estudo, MENDOZA-SÁNCHEZ et al. (2006) ressaltaram que a contagem de células somáticas no leite de quarto mamário das búfalas acima da terceira parição apresentou um coeficiente de regressão negativo e significativo sobre a produção leiteira, a cada mês de lactação, determinando grandes perdas em fêmeas multíparas. CERÓN-MUÑOZ et al. (2002) concluíram que a elevada CCS apresenta um efeito realmente negativo sobre o volume de leite produzido.

A composição físico-química do leite bubalino normalmente define densidade entre 1,025 a 1,047 g/mL; pH entre 6,41 e 6,47; acidez de 14 a 20°D; crioscopia entre -0,531 e -0,548°C; sólidos totais em torno de 15,64 e 17,95%; gordura variando entre 5,4 e 8%; proteína entre 3,6 e 5,26%; minerais entre 0,79 e 0,83%; e lactose como 5,02% (CUNHA NETO & OLIVEIRA, 2003; COELHO et al., 2004; TEIXEIRA et al, 2005).

BASTOS (2005) qualificou como pouco significativas as modificações dos teores de gordura, proteína e de sólidos totais determinadas pela variação do escore do California Mastitis Test (CMT). Não obstante, PASQUINI et al. (2003) e TRIPALDI et al. (2003) verificaram que, além da redução no volume de leite produzido na fazenda, à medida que aumenta a CCS, ocorrem implicações de rentabilidade e qualidade durante a produção de queijo. Em adição, os próprios patógenos causadores da mastite, ainda que minimamente eliminados para o leite ordenhado, podem gerar aumento na contagem global de microrganismos em placa do leite entregue à indústria, além de produzir enzimas e toxinas termoresistentes que representam, respectivamente,

prejuízo à vida de prateleira do produto e risco considerável à saúde humana (GUARINO et al., 1996; TANTILLO et al., 1997; SUPINO et al., 2004).

Nos casos de mastite clínica em búfalas as proteínas do soro do leite, representadas pela albumina e pelas imunoglobulinas, podem ser encontradas em maior quantidade enquanto que há a redução acentuada de quase todas as frações de caseína. Elevam-se o pH e a condutividade elétrica em função das alterações eletrolíticas, que aparecem em função do aumento da irrigação e da permeabilidade no local inflamado. Observa-se uma concentração maior de cloretos, Na, Mg e Ca. Diminui a lactose, principalmente naquelas amostras de mais alta contagem de células somáticas, de maior intensidade de reação ao CMT, de maior concentração bacteriana e com alterações clínicas presentes. O conteúdo mineral do leite aumenta, mas a densidade específica diminui, assim como a gordura (MAHRAN et al., 1992; DHAKAL & KAPUR, 1993; RAWDAT & OMAIMA, 2000; LIMA et al. 2001; BOVERA et al., 2003; ULLAH et al., 2005; BASTOS, 2005).

Ao considerar leite de conjunto, em 1994, a legislação da Comunidade Européia determinou que o leite de origem bovina, caprina, ovina ou bubalina, quando destinado ao consumo humano deve apresentar, entre outras características, uma contagem máxima de células somáticas de 400.000 células/mL (BIERENS, 1993). TRIPALDI et al. (2003) sugeriram um parâmetro de limite igual a 200.000 células/mL para triagem do leite de tanque por terem observado alterações nas etapas de processamento e na característica de textura dos queijos quando as células somáticas estiveram acima deste limite. Assim, TEIXEIRA et al. (2005) citaram também que a contagem de até 200.000 células/mL não interferiu no processo de coagulação do leite, mas que, nos leites com mais de 400.000 células/mL, a coagulação sofreu prejuízos.

Considerando-se as características de rusticidade, que conferem a essas fêmeas uma maior resistência à ocorrência de mastite, o manejo de ordenha muitas vezes carece dos cuidados sanitários de prevenção e controle das infecções, favorecendo o contato entre agentes etiológicos e hospedeiro, que determina colonização ou infecção na glândula mamária das búfalas que exercem maior ou menor influência sobre a

composição do leite, comprometendo toda cadeia produtiva em termos de rendimento, qualidade e segurança na indústria.

Por definição, mastite é o termo derivado da palavra grega mastos e do sufixo itis que significa “inflamação no interior da glândula mamária”, determinada por qualquer tipo de injúria exercida sobre os tecidos internos da glândula mamária. Trata-se de uma enfermidade complexa com diferentes causas, diferentes graus de intensidade e variações em sua duração e em suas conseqüências. Quanto à sua forma de apresentação, é denominada clínica quando acompanhada dos sinais que caracterizam a reação inflamatória (edema, calor, rubor, dor e distúrbios de função). Na ausência destes sinais visíveis, denomina-se mastite subclínica, cujo diagnóstico depende de testes aplicados ao leite que demonstrem os produtos da reação inflamatória e/ou as alterações da composição química da secreção aparentemente sadia (SCHALM et al., 1971).

A glândula mamária torna-se infectada geralmente via canal do teto, quando os microrganismos ultrapassam a barreira física representada pelo esfíncter; vencem uma segunda linha de mecanismos preventivos, que incluem a descamação das células epiteliais e a própria secreção láctea e transpõem a terceira linha de defesa inespecífica, constituída pelo incremento do fluxo sangüíneo e da permeabilidade vascular local, que permitem o aumento da concentração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares. Nesse momento, observa-se o quadro da inflamação do tecido secretor que, na dependência da patogenicidade e virulência do agente etiológico e da intensidade da resposta do hospedeiro, poderá ser expressa com ou sem a presença dos sinais clínicos que caracterizam as mastites clínica e subclínica, respectivamente (KORHONEN & SANDHOLM, 1995).

A barreira física que naturalmente protege a glândula mamária tem início no teto correspondente, cuja porção externa é coberta por um tecido fino desprovido tanto de pêlos quanto de glândulas sebáceas. Nas búfalas essa área apresenta maior concentração de pigmentos de melanina significando, provavelmente, melhor proteção contra irritações cutâneas, de origem ambiental (UPPAL et al., 1994).

Na extremidade distal do teto, encontra-se um estreito canal denominado ducto papilar, com características anatômicas que fazem dele o principal obstáculo para penetração bacteriana. Este ducto termina em um esfíncter, estrutura formada por uma camada de fibras musculares lisas longitudinais seguidas internamente de fibras musculares circulares, que promovem seu fechamento, tanto impedindo a saída espontânea do leite como dificultando a entrada de qualquer tipo de germe (SCHALM et al., 1971; TANHUANPÄÄ, 1995). Nas fêmeas bubalinas ele é mais musculoso por apresentar maior quantidade de fibras e vasos sangüíneos, funcionando como uma barreira mais eficiente e, dessa forma, reduzindo as chances de injúrias, ainda que seus tetos sejam relativamente mais pendulosos e longos que os das vacas (LÁU, 1994; UPPAL et al., 1994). Todavia, a eficiência protetora do esfíncter é reduzida com o avanço da idade e com o estresse da ordenha. Além disso, é sabido que em vacas saudáveis essa musculatura permanece relaxada após a ordenha por um período aproximado de duas horas (SCHALM et al., 1971; TANHUANPÄÄ, 1995).

Internamente, o revestimento do canal do teto consiste de um epitélio escamoso estratificado que, à semelhança da superfície externa, sofre constante descamação reduzindo as chances de colonização local e aumentando a eliminação dos germes pelo fluxo de leite (KAARTINEN, 1995; TIZARD, 2002). Na anatomia bubalina, além dessa camada ser mais espessa, o lúmen do canal é levemente menor que o das vacas, garantindo uma proteção extra à invasão do epitélio (UPPAL et al., 1994). Ainda nessa região, a camada de queratina, com proteínas e ácidos graxos de cadeia longa de efeito bacteriostático, desempenha fundamental papel protetor, particularmente no período seco, quando forma um verdadeiro tampão que veda o orifício à entrada de qualquer contaminante. Conforme ARAÚJO & GHELLER (2005), o fato desta camada ser mais espessa nas búfalas é crucial, pois estes animais tendem a viver em áreas alagadas ou barrentas, onde o contato de patógenos com o canal do teto é potencialmente maior. Segundo SHUKLA et al. (1997) e SHUKLA et al. (2005), o tamanho dos tetos pode também influenciar no aparecimento de quadros infecciosos de mastite, tanto em vacas quanto em búfalas, de maneira que, quando pequenos, a predisposição é maior, provavelmente em função da menor distância a ser seguida

pelos microrganismos. Na porção proximal, o canal do teto separa-se da cisterna do teto pela roseta de Fürstenberg, uma estrutura pregueada que representa importante obstáculo, onde o epitélio passa de cubóide a colunar, tanto em bovinos quanto em bubalinos (UPPAL et al., 1994; KAARTINEN, 1995; TIZARD, 2002).

Os fatores antimicrobianos humorais na secreção láctea são encontrados em concentrações que dependem do controle genético, da fase de lactação e do estado sanitário da glândula mamária. Fisiologicamente, elevam-se durante o período seco, tornam-se abundantes no colostro e estão bastante diminuídos durante o pico da lactação (KAARTINEN, 1995). Entretanto, aumentam incrivelmente quando o úbere está inflamado (SCHALM et al., 1971; SANDHOLM, 1995; TIZARD, 2002). Entre estes fatores estão a lactoferrina, produzida pelas células epiteliais secretoras de leite e pelos fagócitos e a transferrina proveniente do sangue. Ambas são proteínas com ação especialmente bacteriostática por quelarem íons livres de ferro, que serviriam como nutriente fundamental para o crescimento bacteriano, especialmente de estafilococos e coliformes presentes na secreção (KAARTINEN, 1995). A lactoferrina apresenta elevada concentração no leite durante o período seco e encontra-se diminuída durante a lactação, em função do acúmulo de citrato, o qual se liga aos mesmos íons férricos protegendo-os da ação defensiva destas proteínas e garantindo suprimento de ferro às bactérias.

Na presença de mastite, tanto a lactoferrina quanto a transferrina encontram-se em níveis elevados no interior do quarto comprometido a fim de limitar a multiplicação do agente agressor (SCHALM et al., 1971; KAARTINEN, 1995; TIZARD, 2002). Segundo BATHIA & VALSA (1994) as búfalas apresentam a secreção láctea muito mais enriquecida em lactoferrina que as fêmeas bovinas, mas em ambas a quantidade colostrar atinge níveis duas vezes maiores do que os encontrados no início do período lactante, uma variação que, segundo ARAÚJO E GHELLER (2005), possivelmente significa que o teto necessita de maior proteção antibacteriana nesse período.

Lisozimas, lactoperoxidase e complemento são outras proteínas que, apesar de assumirem papel secundário nos mecanismos de defesa do quarto mamário, não deixam de ser importantes. Não obstante a concentração das lisozimas no leite seja

relativamente baixa, sua maior importância está no fato de intensificarem a ação dos anticorpos e do complemento, bem como no estímulo à fagocitose das bactérias. (KAARTINEN, 1995). PRIYADARSHINI & KANSAL (2002) sugerem uma relevante função protetora das lisozimas no quarto mamário de búfalas por terem encontrado uma atividade aumentada em até 1000 vezes em secreções de glândulas clinicamente sadias. Esses autores ainda descrevem que sua atividade é maior no leite de búfalas que no de vacas; chega a ser cinco vezes maior no leite da fase média da lactação que no colostro; e não sofre interferência do número de partos, ainda que seja intensificada em condições climáticas extremas de frio ou calor.

Por sua vez, a atividade antibacteriana da lactoperoxidase se baseia na oxidação de componentes estruturais da parede, sensíveis a enzimas. Entretanto, para agir, depende do conteúdo de oxigênio disponível no leite, assim como da concentração de substratos como tiocianato e peróxido de hidrogênio, cujas produções estão relacionadas, respectivamente, à dieta alimentar e à ação de fagócitos ativados. Considerando-se que a pressão de oxigênio no interior da glândula mamária é muito baixa, não há a formação dos tais peróxidos, o que representa um fator limitante à proteção do úbere inflamado. Entretanto, algumas bactérias, como os estreptococos, podem produzir peróxido de hidrogênio ou, então, ele pode ser obtido com a oxidação do ácido ascórbico. Pelo fato dos componentes que ativam a lactoperoxidase estarem presentes também na cavidade oral dos lactentes, acredita-se que esta enzima desempenhe um papel de certa importância como “desinfetante” dos tetos submetidos ao repasse por bezerros após o término da ordenha (KAARTINEN, 1995). Assim, o manejo que envolve o bezerro ao pé pode ser visto de uma maneira positiva e, além desta conveniência, KUMAR & BARTHIA (1994) observaram que, no leite bubalino, a atividade da lactoperoxidase é 23% maior que no bovino. ARAÚJO & GHELLER (2005) insinuam que esta enzima, além de suas atividades de proteção do teto, pode aumentar a vida útil do produto lácteo no mercado, e, em razão de apresentar maior porcentagem, o leite bubalino tem sua longevidade aumentada.

O sistema complemento, ativado com a formação do complexo antígeno-anticorpo, tem como propósito reconhecer e destruir micróbios e direcionar os fagócitos

aos seus alvos. Chega ao leite em resposta à inflamação, à medida que a permeabilidade da barreira leite-sangue se altera. Entretanto, de acordo com observações in vitro, a inativação do complemento proveniente do sangue pela gordura do leite reduz sua importância (KAARTINEN, 1995; KORHONEN & SANDHOLM, 1995; SANDHOLM, 1995). Tal informação adquire grande relevância na mastite bubalina, uma vez que o leite dessa espécie tem de 2 a 2,5 vezes mais gordura que o das vacas (VALE, 1999). Contudo, quando as bactérias envolvidas no processo são Gram-negativas, sua ativação ocorre pela via alternativa (KAARTINEN, 1995; KORHONEN & SANDHOLM, 1995; SANDHOLM, 1995).

ARAÚJO E GHELLER (2005) citam que, em bovinos, a célula epitelial da glândula mamária quando sofre agressão para auxiliar na resposta inflamatória produz as citocinas IL-8 e TNF- α . Estas citocinas não só aumentam a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares para a região, como também causam maior taxa de ativação destas células, tornando-as eficientes no processo de defesa. Ela também aumenta a população de linfócitos e a produção de anticorpos, mas, conforme esses autores, pode determinar anormalidades hematológicas que devem provavelmente influenciar a qualidade (e quantidade) do leite produzido pela búfala, apesar de não haver estudos sobre o assunto em búfalas.

A resposta imunológica específica da glândula mamária compreende tanto componentes humorais quanto celulares, representados, respectivamente, por anticorpos e linfócitos T que atuam juntamente com os macrófagos acumulados na região da roseta de Fürstenberg, onde nódulos linfóides podem ser encontrados, tanto em vacas quanto em búfalas (UPPAL et al, 1994; KAARTINEN, 1995).

A característica mais importante dos anticorpos do leite está na sua capacidade de opsonizar antígenos, atraindo macrófagos e granulócitos fagocitários; sendo também capazes de neutralizar toxinas e destruir bactérias diretamente, desde que associados ao complemento. No caso de mastite aguda, estas imunoglobulinas se elevam a níveis protetores como resultado da ação inflamatória (TIZARD, 2002).

A quantidade total de imunoglobulinas varia de acordo com o estágio de lactação, de maneira que no colostro das vacas ela se mostra 100 vezes maior que no

leite da primeira semana de lactação. Ao longo da lactação suas concentrações continuam baixas devido à contínua remoção mecânica do leite exercida pela ordenha ou pela sucção do bezerro. Assim, mesmo que a produção de anticorpos pelo organismo animal seja considerável, dificilmente os anticorpos desempenham papel relevante na defesa do úbere. Como característica dos ruminantes, a IgG1, transferida diretamente do soro, é o anticorpo predominante no leite e, juntamente com a IgG2, estimula a fagocitose por macrófagos, sendo esta última responsável pela ação dos neutrófilos. Uma outra imunoglobulina presente no leite de ruminantes é a IgA, produzida ali mesmo na glândula mamária, ainda que seus precursores se formem nas placas de Peyer do intestino. Contudo, por ser altamente hidrofóbica e se ligar aos glóbulos de gordura e às micelas de caseína, muito pouco deste anticorpo pode ser encontrado no soro do leite (KORHONEN & SANDHOLM, 1995).

Apesar da possibilidade da concentração de anticorpos nas secreções mamárias ser considerada uma medida direta da maturidade ou salubridade imune da búfala, ARAÚJO & GHELLER (2005) sugeriram que a presença destes anticorpos no leite serve mais ao consumidor natural do leite (o bezerro bubalino) do que propriamente à búfala. Dessa maneira, a defesa da glândula mamária dos animais de produção está grandemente dependente dos mecanismos inespecíficos, dentre os quais os leucócitos representam a forma mais eficiente de combate à infecção.

O termo “células somáticas” foi criado para fazer referência ao conjunto de células epiteliais descamativas dos alvéolos, da cisterna da glândula mamária e da cisterna do teto, mais os leucócitos, que se acham representados por macrófagos, linfócitos e principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Ambos os tipos celulares, estruturais e de defesa, estão presentes, tanto na secreção láctea normal, quanto naquela alterada por motivos patológicos ou fisiológicos. Particularmente, os leucócitos podem ser encontrados também na secreção ou como infiltrados nas camadas intra e subepiteliais da roseta de Fürstenberg (SCHALM et al., 1971; UPPAL et al., 1994; BARBERIO et al., 1999; HARMON, 1994).

Procurando identificar os tipos celulares presentes no leite bubalino e estabelecer uma relação entre suas proporções e o estado de higidez da glândula

mamária, DHAKAL et al. (1992) observaram que no leite normal predominavam as células epiteliais (48,42%), seguidas de linfócitos (29,28%), neutrófilos (20,98%) e monócitos (1,62%). Por outro lado, SILVA & SILVA (1994) e SILVA et al. (1996) notificaram neutrófilos predominando com média de 56% da contagem total, sendo os linfócitos o segundo tipo mais comum, com 28%. Em ambos os trabalhos relataram que os macrófagos, as células epiteliais e os eosinófilos constituíram médias respectivas de 8%, 5% e 1%, havendo 2% de células necrosadas. DELLA LIBERA et al. (2004) acharam em amostras de leite normais 61,1% de monócitos/macrófagos, 32,9% de neutrófilos, 5,3% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos e KAPRONEZAI (2004) uma mediana de 600 células polimorfonucleares/mL em comparação a 1.150 células mononucleares/mL em amostras de leite sem isolamento de microrganismos.

Estudando as características celulares em rebanhos bubalinos, sem separarem quartos mamários conforme a presença ou ausência de alterações inflamatórias ou de infecção, PETROVA & TZANKOVA (1999) observaram que 66,7% das amostras estudadas na fase média da lactação estavam com contagem abaixo de 500.000 células/mL; 17,30%, entre 500.001 e 1.000.000 e 16% superior a 1.000.000 células/mL.

CERÓN-MUÑOZ et al. (2002) encontraram uma média de 63.610 células/mL nas 2.693 amostras de leite bubalino que avaliaram, das quais e 37,65% apresentaram CCS inferior a 17.000 células/mL, o que correspondeu à contagem de células somáticas transformada (CCST) de -0,48. No trabalho de OLIVEIRA (2003), a média das contagens foi 170.260 células/mL em 548 análises, variando de 0 a 1.254.000 células/mL, com 93,43% das amostras com CCS abaixo de 250.000 células/mL e 2,18% acima de 500.000 células/mL. Nas mesmas condições, KAPRONEZAI (2004) obteve média de 23.000 células/mL no leite de 262 quartos mamários.

JORGE et al. (2005) encontraram média de 63.380 células/mL em 544 amostras, das quais 76,7% apresentaram CCS inferior a 17.000 células/mL. Esses autores observaram ainda que 18,87% das amostras contagem celular igual a zero; 63,29%, abaixo de 50.000 células/mL; 13,72%, de 50.001 a 100.000 células/mL; e 4,12%, mais que 100.000 células/mL.

Em quartos mamários bovinos sadios segundo pontos de vista clínico, subclínico e microbiológico, a contagem de células somáticas (CCS) é menor que 100.000 células/mL (SCHALM et al., 1971). Nas búfalas leiteiras, diversos autores confirmaram as contagens relativamente inferiores. Independente do intervalo entre ordenhas, número de parições ou estágio de lactação, mas sempre analisando amostras de leite de glândulas sem alterações clínicas e subclínicas: SILVA & SILVA (1994) se depararam com uma variação entre 50.000 e 375.000 células/mL. MEIRELLES (1997) obteve média de 39.109 células/mL. SINGH & LUDRI (2001) relataram uma média de 100.000 células/mL de leite; no levantamento de OLIVEIRA (2003), as contagens variaram de 0 a 1.254.000 células/mL; DELLA LIBERA et al. (2004) encontraram mediana de 13.000 células/mL e, considerando apenas as amostras com exame microbiológico negativo, KAPRONEZAI (2004) obteve uma mediana de 1.900 células/mL.

Quando foram comparar amostras de leite de glândulas mamárias sadias obtidas de um grupo de búfalas na fase de colostro com outro grupo na fase média de lactação, OGNEAN et al. (2003), obtiveram contagens médias respectivas de 87.540 e 36.700 células/mL. SINGH & LUDRI (2001) relataram que as diferenças não foram significativas entre as diferentes fases de uma mesma lactação, ainda que uma elevação de células somáticas tenha ocorrido durante os últimos estágios. A mesma ausência de grandes variações foi verificada por BASTOS (2005), nas contagens iguais a 29.000, 29.000 e 16.000 células/mL para, respectivamente, as fases inicial, intermediária e final de lactação. CERÓN-MUÑOZ et al. (2002) observaram uma redução da CCST no segundo mês de lactação seguida de gradativa elevação até o nono mês. Em trabalho de revisão, AMARAL et al. (2005) sugeriram ser este um aumento aparente provocado pela redução fisiológica do volume de leite, que deixa de diluir as células somáticas.

Embora os quartos sadios de búfalas leiteiras contem com uma concentração menor de células somáticas em relação às vacas, SILVA & SILVA (1994) e SILVA (1996) relataram um maior número de neutrófilos prontos para fagocitarem rápida e eficientemente os patógenos invasores, da mesma forma que os neutrófilos

sangüíneos. Além disso, DELLA LIBERA et al. (2006), observaram que os macrófagos não elicitados presentes no leite bubalino são significativamente capazes de se disseminar, fagocitar e liberar peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou não. Por outro lado, DE & REENA (2005) demonstraram que tal eficiência não é uma constante durante o período de lactação, sendo reduzidas as capacidades de fagocitose e de produção de peróxido de hidrogênio por parte dos leucócitos no período pós-parto, sugerindo ser este um fator fundamental para o surgimento de casos clínicos em búfalas recém-paridas.

Dentro de um mesmo processo de ordenha de búfalas aparentemente saudáveis, DHAKAL et al. (1991) observaram 1.200.000 células somáticas/mL nos jatos de descarte na caneca de fundo escuro e 96.000 células/mL em amostras do início da ordenha. Da mesma forma, SINGH & BANSAL (2004) verificaram que o conteúdo celular diminuiu gradativamente desde os jatos descartados no teste da caneca até final da ordenha. Em um estudo anterior, os achados de DHAKAL et al. (1992) não revelaram diferenças significativas na composição celular do leite entre os dois momentos da ordenha. Em contrapartida, de acordo com BASTOS (2005), a CCS aumentou de 29.000 a 56.000 células/mL entre as amostras de glândulas mamárias saudáveis colhidas no início e no final da ordenha.

SINGH & LUDRI (2001) em amostras de leite de búfalas sadias encontraram baixa CCS durante as estações indianas de frio (76.000 células/mL) e de calor seco (108.000 células/mL), aumentando na estação de calor úmido (135.000 células/mL). Segundo AMARAL et al. (2005) a maior CCS no último período pode ser devida às severas condições climáticas que, conduzindo a situações de estresse incrementam a susceptibilidade a infecções. Também propõem que as alterações estacionais não devem ser consideradas como o fator determinante da variação da CCS, sendo, na verdade, fatores predisponentes à contaminação bacteriana dos tetos durante períodos em que as condições de crescimento microbiano são mais favoráveis sem que sejam incrementadas as medidas de higiene de ordenha e de ambiente.

Durante a inflamação, a CCS do leite da glândula bovina em lactação pode elevar-se para mais de 1.000.000 células/mL (SCHALM et al., 1971). No entanto, o uso

de parâmetros bovinos de CCS para a inferência de mastite em búfalas tem se mostrado inadequado, pois os valores das contagens são significativamente menores em bubalinos do que nas vacas (AMARAL et al., 2005; ARAÚJO & GHELLER, 2005).

Ao induzirem experimentalmente quadros assépticos de mastite subclínica em búfalas, SILVA et al. (1996) elevaram a CCS de 50.000 para 75.000.000 células/mL, dos quais 90% foram neutrófilos.

CERÓN-MUÑOZ et al. (2002) adotaram a contagem acima de 283.000 células/mL como ponto de partida para considerar a presença de mastite subclínica em búfalas. Ao analisarem microbiologicamente, pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias por mL, amostras de leite bubalino com CCS acima de 200.000 células/mL, MORONI et al. (2006), evidenciaram a presença de infecção intramamária em 100% dos quartos, enquanto 98% dos quartos com contagem inferior a esta estiveram livres de infecção. De acordo com esses autores, esse valor apresenta uma sensibilidade de 99,1% e uma especificidade de 100% na identificação respectiva de quartos com e sem infecção. Na presença de infecção, o escore de contagem de células somáticas transformada foi de 2,93 em comparação com 2,49 dos quartos não infectados.

PICCININI et al. (2006) sugeriram a contagem de 400.000 células/mL como ponto de triagem para o leite bubalino. Entretanto, uma grande parte dos autores revisados adotou o valor de 500.000 células/mL para selecionar os quartos com presença ou ausência do quadro subclínico, sem necessariamente utilizarem a confirmação microbiológica (VIANNI et al., 1990; RANUCCI et al., 1988; TUTEJA et al. 2001; SINGH et al., 2002; SINGH et al., 2004; VIVEK et al., 2002; DHAKAL, 2004).

Incluindo os resultados de exames microbiológicos à classificação baseada na contagem de 500.000 células/mL, DHAKAL et al. (1992) chamaram de processos inflamatórios inespecíficos aqueles que contavam com mais de 500.000 células/mL acompanhados de exame microbiológico negativo em amostras de leite de búfalas. Confirmaram a presença da mastite subclínica quando esse valor esteve associado a microrganismos, mas, ainda que os valores de células somáticas tivessem sido menores e os agentes etiológicos ausentes, não definiram o quarto mamário como

necessariamente sadio. Mostraram, também, um aumento da contagem celular proporcional à contagem bacteriana do quarto e que a proporção de neutrófilos foi significativamente maior no leite mastítico, particularmente em amostras de casos clínicos. MEIRELLES (1997) encontrou CCS média de 32.772 células/mL para amostras de leite de búfalas positivas nos exames bacteriológicos.

Assim como acontece nos estudos com quartos mamários saudáveis, alguns fatores interferem na quantidade de células presentes nos quadros subclínicos. Apesar do trabalho realizado por DHAKAL et al. (1992) ter concluído pela ausência de interferência do momento da ordenha na contagem em amostras de leite de quartos mamários com mastite subclínica, DHAKAL et al. (1991) já haviam sugerido que esta existe, sendo significativamente maior nos jatos descartados no teste da caneca de fundo escuro (3.200.000 células/mL) que nos jatos do início da ordenha (2.300.000 células/mL). Encontraram, ainda, uma correlação positiva entre o conteúdo total de células e a contagem de bactérias em uma mesma amostra. DHAKAL (1995) observou, em amostras de leite de glândulas mamárias com mastite subclínica, uma quantidade significativamente maior na contagem de células somáticas feita duas semanas antes do período de secagem em relação a uma semana após o parto.

Em bovinos ZAFALON et al. (1999) estudaram a influência do *Corynebacterium* spp. e dos *Staphylococcus* spp. coagulase positivos (SCP) e coagulase negativos (SCN) sobre a CCS de quartos mamários comprometidos pela mastite clínica causada por esses microrganismos. Comparando os quartos afetados com seus homólogos sadios, ressaltaram que alguns gêneros bacterianos exercem maior influência sobre a contagem de células somáticas. Assim, a maior variação foi determinada pelos SCN, que, nos quartos de onde foram isolados, provocaram uma variação de 862,7%, ou seja, uma elevação de 75.000 para 722.000 células/mL entre os quartos sadios e os afetados. Em seguida vieram os estafilococos coagulase positivos, com elevação de 613,0% (de 92.000 para 656.000 células/mL) e os *Corynebacterium* spp, que determinaram a variação de 548,2% (de 137.000 para 888.000 células/mL). KAPRONEZAI (2004), encontrou medianas iguais a 8.500 células/mL quando estafilococos foram isolados, 10.350 células/mL com *Streptococcus* spp. e 9.600

células/mL quando havia *Corynebacterium* spp.. O maior escore observado por MORONI et al. (2006) esteve nos quartos infectados por estreptococos, 3,62, seguido dos SCN com 2,80.

Reconhecendo-se o papel desempenhado pelas alterações subclínicas da glândula mamária sobre a composição do leite, a CCS dos quartos mamários pode ser considerada também nos laticínios um bom indicador da qualidade higiênica da matéria-prima que será empregada no processamento do queijo, a fim de garantir segurança ao produto final, já que, indiretamente, pode representar o risco da ocorrência de patógenos e resíduos de antibióticos. Com vistas a estudarem a relação entre a CCS e a composição do leite empregando amostras individualizadas de quartos mamários de búfalas, PICCININI et al. (2006) encontraram alterações significativas quando esta superou 400.000 células/mL, sugerindo este como um limite interessante para a indústria na triagem da glândula mamária sadia de búfalas leiteiras. No estudo de PETROVA & TZANKOVA (1999), reduções de 1,85% e 3,25% nos valores respectivos de gordura e proteína foram observados quando a CCS ficou entre 500.001 e 1.000.000 células/mL, intensificando-se quando a contagem superou este último.

Em qualquer espécie mamífera o aumento da celularidade no leite indica a presença de reação inflamatória e o diagnóstico é fundamental para evitar perdas econômicas e aumentar as chances de recuperação do animal (SINGH et al., 2004). O desenvolvimento de equipamentos para contagem automática de células somáticas tornou possível a triagem e o exame de maior quantidade de vacas e rebanhos, facilitando os estudos relacionados ao manejo e à incidência de mastite no campo na espécie bovina (PHILPOT, 1986). Estimulou, ainda, o acompanhamento regular da situação individual dos animais em lactação, com a finalidade de melhorar as condições higiênicas, bem como a qualidade do produto que é enviado aos laticínios (ANDREWS, 1983).

Também na bubalinocultura leiteira a contagem automática das células somáticas tem sido considerada o mais preciso e confiável indicador da existência de mastite subclínica (RANUCCI et al., 1988; NAZEM & AZAB, 1998). Todavia, em seu estudo empregando a contagem automática de células na avaliação do leite de búfalas,

OLIVEIRA (2003) lembrou que nesse método, contagens iguais a zero não se relacionam à ausência de células, mas representam sim uma quantidade menor que 1.000 células/mL de leite que deixa de ser detectada pelo equipamento de contagem.

A mão-de-obra, o tempo e a estrutura laboratorial exigidos para o emprego dessa técnica têm, ao longo do tempo, estimulado o desenvolvimento de muitos testes indiretos, principalmente na espécie bovina, a fim de identificar alterações na glândula mamária relacionadas à permeabilidade capilar, dano tissular, número de células somáticas, pH, viscosidade, teor de cloretos, condutividade elétrica e catalase (KOTHE et al., 1993; SILVA et al. 1996; KUMAR & THAKUR, 2001).

Entre estes encontra-se o California Mastitis Test (CMT) desenvolvido por SCHALM & NOORLANDER (1957). De acordo com SCHALM et al. (1971), a primeira descrição do CMT determinou que tratava-se de um indicador sensível da presença de inflamação no úbere, apesar de não ser capaz de distinguir as causas dessa inflamação. Assim, ficou estabelecido que este método diagnóstico teria como fundamento a reação determinada por um detergente aniônico (alquil laurilsulfonato de sódio) capaz de emulsionar os lipídios das membranas das células epiteliais e dos leucócitos presentes no leite, liberando o seu material genético (DNA) e determinando formação de um composto gelificado correspondente à quantidade de células presentes. Em amostras de leite bovino, a intensidade da reação produzida pelo CMT é classificada em cinco escores: a) negativo (de 0 a 200.000 células/mL); b) traços ou suspeito (150.000 a 500.000 células/mL); 1+ (400.000 a 1.500.000 células/mL); 2+ (800.000 a 5.000.000 células/mL); e 3+ (com mais de 5.000.000 células/mL).

Embora tenha sido padronizado para o leite bovino, alguns autores acreditam que o CMT pode assumir um papel de fundamental importância no diagnóstico a campo das formas subclínicas de mastite bubalina, em função de suas características de praticidade, rapidez e baixo custo. (XIA, 2006; RANUCCI et al., 1988; NAZEM & AZAB, 1998).

Assim, ao estabelecerem a contagem de 500.000 células somáticas/mL como ponto de partida para definir os quadros de mastite subclínica, VIANNI et al. (1990) observaram uma elevada concordância (93,7%) com os resultados CMT positivos

defendendo a eficiência do CMT na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. JORGE et al. (2005) também encontraram uma correlação significativamente positiva entre os métodos, igual a 0,53. Nesse trabalho, as amostras CMT negativas tiveram CCS média de 12.830 células/mL; para o CMT 1+ a CCS foi de 177.320 células/mL; para 2+, 641.850 células/mL; e 3+, 2.949.440 células/mL.

Tendo verificado uma baixa correlação entre o CMT e a CCS, THOMAS (2004) sugeriu muito cuidado no emprego do CMT para estimar o conteúdo celular do leite bubalino. Ainda que tenham encontrado uma frequência de quartos negativos ao CMT sem isolamento de microrganismos estatisticamente maior do que a frequência de quartos positivos no CMT e sem isolamento, KAPRONEZAI et al. (2005) também concluíram que o CMT não é um bom teste para triagem de mastite em bubalinos.

Guardando as diferenças da quantidade de células presentes na reação inflamatória da glândula mamária de búfalas, quando DHAKAL (2006), assim como diversos autores, estipularam a contagem superior a 200.000 células/mL como definição de mastite subclínica, observaram a capacidade do CMT em encontrar quartos positivos sofrer grande redução. Dessa forma, em seu trabalho, 94% das amostras negativas ao CMT eram, na realidade, portadoras de mastite subclínica conforme os critérios adotados.

OLIVEIRA (1997), em seu estudo com 196 amostras de leite de búfalas criadas no sul do Estado de Pernambuco, observou sensibilidade e especificidade baixas do CMT frente ao isolamento bacteriano. Para OLIVEIRA (2003), o CMT apresentou uma especificidade de 95,2% e uma sensibilidade de 36,84%.

Demonstrando a capacidade limitada do CMT em identificar os quartos mamários comprometidos pela mastite subclínica em búfalas, ao substituir a reação 1+ do CMT mais exame microbiológico positivo pela CCS acima de 300.000 células/mL mais microbiológico positivo, DHAKAL (1995) observou um aumento na prevalência de 12,5% para 14,85% dos quartos nas duas semanas antes da secagem e de 5,69% para 10,47% uma semana após o parto.

Por outro lado, no Egito, comparando o CMT com o isolamento microbiológico, EL SAGHEER et al. (1992) certificaram-se de que a maior porcentagem dos agentes foi

isolada dos quartos mamários que apresentaram a maior intensidade de reação ao CMT 3+. Da mesma maneira, CUNHA et al. (2006) observando os diferentes escores de reação, obtiveram isolamento de 38,10% daquelas com reação 1+, de 85,11% de todas com reação 2+ e de 94,29% das que apresentaram CMT 3+.

Contudo, apesar de apresentar casos de confirmação microbiológica em búfalas, este método pode apresentar algumas desvantagens, como o fato de não determinar com exatidão a quantidade de células somáticas presentes na amostra e de ter suas reações classificadas de modo subjetivo (SCHALM et al., 1971). THOMAS et al. (2005) também observaram que, enquanto 15% dos quartos mamários analisados foram CMT positivos, a avaliação da infecção revelou positividade em apenas 12%. Tais problemas podem acompanhar os resultados positivos no CMT em consequência dos vários fatores fisiológicos ou de manejo que interferem no conteúdo celular do quarto mamário: período de lactação, momento da ordenha em que os jatos são coletados, épocas do ano, idade das vacas e intervalos entre as ordenhas (SALONIEMI, 1995; THIERS et al., 1999).

BASTOS (2005) verificou que as intensidades do CMT aumentaram gradativamente com o evoluir da fase da lactação, acompanhando o aumento do número de células somáticas do leite. Resultados positivos sem confirmação microbiológica foram apresentados por LÁU et al. (1986) devido à ausência de isolamento de microrganismos quando incluíram exames microbiológicos na avaliação de amostras CMT positivas. No entanto, ainda que LANGONI et al. (2001), tenham avaliado microbiologicamente apenas amostras de leite oriundas de búfalas com mastite subclínica com reação 3+, observaram que 46,1% delas se mostraram microbiologicamente negativas. Entretanto, sugeriram que tal fato se devesse a casos de mastites assépticas ou por microrganismos que exigissem condições especiais de isolamento.

Grande parte dos artigos científicos relacionados à prevalência da mastite bubalina são publicados na Índia e no Paquistão, pois nestes países a bubalinocultura é bastante desenvolvida e a produção leiteira constitui o principal objetivo dessa exploração. Na propriedade, as perdas econômicas são representadas pela redução da

quantidade de leite produzida pelos quartos afetados, descarte do leite tratado e gastos com tratamentos e honorários veterinários (CADY et al., 1983; HAMZA & CHOUDHURI, 1994). De acordo com SINGH & SINGH (1994), a mastite clínica e a subclínica em bubalinos determinam, juntas, perdas de 17,5% na produção de leite; e somente os quadros subclínicos provocam uma redução em torno de 0,35 L de leite/animal/dia.

Nos bovinos, a mastite subclínica de origem infecciosa é 25 a 30 vezes mais freqüente que a mastite clínica, no rebanho (DODD, 1983). Entretanto, as diferenças relacionadas à imunidade inespecífica do organismo das búfalas leiteiras determinam prevalências menores de mastite (SAINI et al., 1994; BRIÑEZ et al., 2000). Apesar disso, diversos pesquisadores demonstraram que a porcentagem de quadros infecciosos varia significativamente em função dos próprios fatores relacionados à fisiologia, ao ambiente ou ainda aos manejos zootécnicos.

As práticas de manejo, resposta imune, estruturas da mama, o nível de controle de mastite bem como a freqüência relativa de ocorrência de patógenos oportunistas da microbiota da pele, devem ser levados em consideração na diferenciação da etiologia dos quadros infecciosos de mastite entre vacas e búfalas (THIRUNVUKKARASU & PRABAHARAN, 1998; SHAILJA & MAHENDRA, 2002). O manejo incluindo o tratamento dos tetos à secagem também determinou significativa redução da incidência de mastite no período seco, de acordo com TUTEJA et al. (2002). Para THOMAS et al. (2005), a avaliação da infecção em quartos positivos ao CMT revelou que as bactérias de origem ambiental acometeram principalmente os grandes rebanhos submetidos à ordenha manual, permitindo que concluíssem que o manejo de ordenha influencia a ocorrência dos casos de mastite de maneira mais significativa que o tamanho do rebanho. Enquanto os grandes rebanhos submetidos à ordenha mecânica foram mais acometidos, nos pequenos com ordenha manual houve menor prevalência. A ordenha mecânica sozinha não determinou problemas para a saúde da glândula. Observaram, ainda, que o uso de bezerros para estimular a descida do leite esteve relacionado a uma menor ocorrência de mastite infecciosa no rebanho.

A manipulação dos quartos tem conferido, ao longo dos anos, maior importância aos casos de mastite micótica, em função de fatores como tratamento de mastite sem

diagnóstico apropriado, administração prolongada de antibióticos e esteróides e contaminação por infusões intramamárias. A mastite por fungos e leveduras foi descrita por vários autores, incluindo MAHAPATRA et al. (1996), em casos clínicos e subclínicos onde estes agentes foram isolados em culturas puras (8,10%) ou em associação com bactérias (4,05%), dentre os quais destacaram-se as candidas (5,04%) e *Aspergillus* spp. (2,7%). CHHABRA et al. (1996) demonstraram a presença de fungos em animais com mastite subclínica, tendo isolado fungos e leveduras de 10% e 16,6% das amostras, respectivamente.

Em função do hábito aquático, espera-se que as búfalas apresentem elevada taxa de mastites de origem ambiental. BRADLEY & GREEN (2000) e BRADLEY & GREEN (2001) demonstraram que a *E. coli* apresenta grande facilidade em acessar a mama durante o período de estiagem e persistir, somente ressurgindo como causadora de doença clínica posteriormente. Todavia, MUHAMMAD et al. (1995) observaram que, em comparação aos agentes classificados como contagiosos, estes agentes ambientais desempenham um papel muito menor nos casos de mastite clínica em búfalas.

CERÓN-MUÑOZ et al. (2002) observaram 3,2% das amostras com CCS acima de 283.000 células/mL, o que correspondeu à CCST de 4,91. DHAKAL (2006) reconhecendo em seu estudos os critérios de triagem com contagem superior a 500.000 células/mL se depararam com uma prevalência de mastite subclínica de 8%. Por fim, considerando mastite subclínica como a CCS acima de 200.000 células/mL, PICCININI et al. (2006) encontraram maior frequência após o primeiro trimestre da lactação.

Agregando resultados microbiológicos à contagem de células somáticas, TUTEJA et al. (2001) observaram que, apesar de também terem considerado 500.000 células/mL como o parâmetro de classificação dos casos subclínicos, as bactérias estiveram presentes em apenas 27,45% dos quartos. E, deles, isolaram 100% dos *Streptococcus dysgalactiae*; o mesmo acontecendo com 54,4% dos *Staphylococcus aureus*; e com 23,59% dos *S. epidermidis*. Por sua vez, VIVEK et al. (2002) isolaram microrganismos de 89 (59,73%) das 149 amostras de leite com mais de 500.000 células/mL.

Na Índia, ao avaliar glândulas mamárias de búfalas pelo teste da caneca de fundo escuro e pelo CMT, RASHID (2001) observou resultados positivos em respectivamente 2,61% e 6,71% e, ao submeter tais amostras ao exame microbiológico para pesquisa de quadros infecciosos, observou que o agente mais comum foi *Streptococcus pyogenes* (35,46%) seguido por *Staphylococcus aureus* (33,99%), *Escherichia coli* (27,09%), *Pseudomonas* spp. (1,97%) e *Corynebacterium pyogenes* (1,48%). Da mesma maneira, SINGH & SINGH (1994) observaram 24,4% de prevalência para mastite subclínica. Semelhantes resultados foram encontrados por MITRA et al. (1995), em cujo levantamento a porcentagem de quartos com alterações subclínicas foi de 21,96%. Destas amostras positivas foram isolados *Staphylococcus* spp. em 41,37%, *Streptococcus* spp. em 27,58%, *Escherichia coli* em 24,13% e *Corynebacterium* spp. em 6,89%. Empregando o teste da caneca de fundo escuro, TIJARE et al. (1999) não diagnosticaram nenhum quadro de mastite clínica, mas entre os 467 quartos mamários sadios que avaliaram, o exame microbiológico revelou positividade em 26,77% e entre os isolamentos, 38,99% foram bactérias do gênero estafilococos

Nos casos de mastite subclínica identificados por NAIKNAWARE et al. (1998) o exame microbiológico revelou que os estafilococos foram os agentes predominantes, seguidos pelos *Streptococcus* spp.. SHUKLA et al. (2005) com base em avaliação microbiológica evidenciaram prevalências de mastites clínicas e subclínicas iguais a 7,50% e 42,50%, respectivamente. MORONI et al. (2006) isolaram microrganismos em 63% do total de quartos clinicamente sadios. Entre os quartos positivos, os estafilococos coagulase negativos foram os patógenos mais comuns aparecendo em 78,4% das amostras, sendo seguidos pelo *Streptococcus* sp. em 15% e por outros microrganismos dentre os quais destacou-se o *Bacillus* sp..

No trabalho de VIANNI et al. (1990), no Brasil, 8,8% dos 159 quartos avaliados apresentaram mastite subclínica segundo o CMT. GUIDO et al. (1994) citado por KAPRONEZAI (2004) AMARAL et al. (2005) avaliaram 250 amostras de leite pelo CMT e encontraram 30,4% dos animais positivos. Com base apenas no isolamento microbiológico, MEIRELLES (1997), recuperou agentes microbianos em 73,41% de 173

amostras de leite de búfalas. OLIVEIRA (1997) relatou a presença de microrganismos em 70,9% das 130 amostras que estudou, descrevendo a ocorrência de estafilococos em 38,8% das amostras e dentre estes, 76,3% foram estafilococos coagulase negativos. Não encontrou *Corynebacterium* spp., mas isolou *Bacillus* spp. como 22,9% dos isolamentos, bacilo Gram-positivo em 12,7%, *Streptococcus* spp. em 4,1% e *Micrococcus* spp. em 1,5%.

Em estudo realizado no Vale do Ribeira, COSTA et al. (1997b) revelaram uma prevalência de mastite subclínica em 14,5% de 1.252 quartos pertencentes a búfalas primíparas e pluríparas. A avaliação microbiológica destas amostras evidenciou 23,7% de infecção. Destacaram *Corynebacterium* spp. em 59,25% e *Staphylococcus* spp. em 17,59% (principalmente os coagulase positivos), ainda que também houvessem sido isolados *Streptococcus agalactiae* (12,96%), *Enterobacteriaceae* (2,8%) e *Micrococcus* spp. (0,9%). Avaliando 454 amostras de leite bubalino, COSTA (1999) encontraram 170 (37,44%) com resultados positivos ao exame microbiológico e nestes também os estafilococos predominaram com 45,30% dos isolamentos, seguidos dos *Corynebacterium* spp. (27,64%) e dos *Streptococcus* spp. (1,76%) e no restante (25,30%), houve associações entre estes agentes. Em outro levantamento no Estado de São Paulo, COSTA et al. (2000) avaliaram 778 búfalas em lactação e encontraram a prevalência da mastite clínica em termos de quartos mamários igual a 0,44% e, para a mastite subclínica, 7,15%. Observaram que para os casos de mastite clínica destacaram-se *Corynebacterium* spp. (37,5%), *S. uberis* (25,0%) e o *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (25,0%). Na mastite subclínica foram isolados principalmente *Staphylococcus* spp. (20,97%), *Corynebacterium* spp. (19,76%) e *Streptococcus* spp. (16,94%). Segundo esses autores, a porcentagem de casos desencadeados por SCN foi significativamente menor que a ocorrência de mastites por *Staphylococcus* spp. coagulase positivo.

JORGE et al. (2005) avaliando 544 amostras de leite encontraram 82,35% como CMT negativas. Entre os CMT reagentes, 2,76% apresentaram escore 1+; 2,02%, 2+; e 1,84% com resultado 3+. No exame das 154 amostras de leite de búfalas da raça Murrah com reações 3+ para mastite subclínica, LANGONI et al. (2001) obtiveram

isolamento de *Corynebacterium bovis* (31,7%), *Staphylococcus epidermidis* (30,5%), *Streptococcus agalactiae* (26,9%), *Staphylococcus aureus* (4,9%), *Actinobacter calcoaceticus* (2,4%), *Pasteurella multocida* (2,4%) e *Bacillus* spp. (1,2%). OLIVEIRA (2003) apresentou uma frequência de mastite subclínica igual a 16,8% do total de quartos mamários e a mastite clínica esteve ausente. Classificando os escores de CMT, não encontraram nenhuma búfala com reação 3+, apenas 2% dos quartos com reação 2+ e 2,2% com reação 1+. Os CMT negativos foram 95,8%. Revelaram a presença de agentes em 10,77% dos quartos nos quais predominou os estafilococos coagulase negativos, dos quais o *S. epidermidis* foi o mais freqüente.

KAPRONEZAI et al. (2005) estudando 262 quartos mamários de búfalas observaram respectivamente, alterações clínicas e subclínicas em 0,4% e em 3,4% deles. Distribuindo pelos 262 quartos analisados esses resultados positivos conforme a intensidade de reação, encontraram: 8,0% traços; 1,5% reação 1+; 1,15% reação 2+; e 1,15% reação 3+. Dentre as 64 amostras (24,4%) onde obtiveram crescimento microbiano, encontraram que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. foi estatisticamente maior do que a dos outros agentes encontrados. CUNHA et al. (2006) encontraram alterações ao teste da caneca de fundo escuro em 14 (2,73%) quartos estudados e em outros 103 (20,12%), reações positivas ao CMT que tiveram os seguintes escores: 21 (20,39%) apresentaram reação 1+, 47 (45,63%), reação 2+ e 35 (33,98%), 3+. Isolaram microrganismos de 85,71% das suas amostras com alterações clínicas e de 78,64% das positivas ao CMT e a bactéria mais prevalente nos dois casos foi o *Staphylococcus* spp., dos quais 20% das amostras foram coagulase positiva. A porcentagem de culturas puras de *Streptococcus* spp., neste estudo, foi de 25,00% nos casos clínicos e de 13,58% nos casos subclínicos. Os *Corynebacterium* spp. representaram 8,33% dos isolamentos das amostras de leite de quartos com mastite clínica e 13,58% das subclínicas. O *Micrococcus* spp. foi isolado em apenas 1,23% das amostras de leite com mastite subclínica.

Em seu levantamento, RANUCCI et al. (1988) confirmaram a hipótese da influência da fase de lactação sobre a prevalência de mastite subclínica, ao considerar o quadro definido pela contagem acima de 500.000 células/mL, uma vez que ocorreu

aumento proporcional deste componente com o avanço dos meses de lactação. De outra forma, com base no diagnóstico microbiológico KUMAR & SHARMA (2002) verificaram que a maior prevalência de mastites ocorreu nos primeiros três meses de lactação, quando estiveram positivas 57,65% das suas amostras analisadas pelo exame microbiológico.

BASTOS (2005) também observou que o número de isolamentos bacterianos aumentou significativamente com o evoluir da lactação, e de glândulas mamárias que não apresentavam sinais de processo inflamatório ou que não tivessem sido submetidas a tratamento intramamário, relatou o isolamento dos seguintes gêneros bacterianos mais freqüentes: *Corynebacterium* spp. (28,5%); *Staphylococcus* spp. (24,7%); *Streptococcus* spp. (15,8%) e *Actinomyces* spp. (11,4%). Para JOSHI & GOKHALE (2006), a maior predisposição para mastite permaneceu entre o 4º e o 5º mês de lactação, enquanto para PREM et al. (1995) e SINGH et al. (2001) as infecções foram respectivamente mais altas entre 0 e 40 e 0 e 90 dias pós-parto. Na pesquisa de DHAKAL (1995) com animais duas semanas pré-secagem e uma semana no pós-parto, 50,44% dos quartos mamários estavam infectados no primeiro grupo e 47,62% dos quartos no período pós-parto. Os estafilococos foram os organismos mais prevalentes, respondendo por 22,5% dos isolamentos na fase de secagem e por 17,64% uma semana no pós-parto. Em seguida apareceram os estreptococos na secagem e bacilos Gram negativos não coliformes no pós-parto.

Ao acompanhar as mesmas búfalas durante toda uma lactação, MORONI et al. (2006) relataram que nenhuma das fêmeas permaneceu sem infecção ao longo de uma lactação, principalmente quando apresentavam maior produção de leite. Segundo esses autores, os riscos de infecção foram menores no início da ordenha, aumentando com o evoluir da lactação, pois a prevalência das infecções intramamárias atingiu o máximo de 79% durante o terceiro mês de lactação, diminuiu para aproximados 60% ao sexto mês e aumentou novamente para 75% dos quartos no final da lactação. Com base apenas na reação ao CMT, COSTA et al. (1997a) identificaram positividade em 5,63% das amostras de leite estudadas na fase inicial de lactação definida entre 1 e 75 dias pós-parto; em 6,75% daquelas entre 76 e 150 dias pós-parto (fase média); e em

3,13% das avaliadas no final da lactação (151 a 195 dias). Ao relacionarem o estágio de lactação com a presença de agentes infecciosos, encontraram uma prevalência de infecção igual a 42,25% no início de lactação; de 33,34% no meio da lactação; e de 20,31% no final da lactação, sendo *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. os agentes mais freqüentemente isolados nessas três fases.

Sugerindo uma alteração funcional do esfíncter, RANUCCI et al. (1988) e SHUKLA et al. (2005) citaram um aumento dos casos subclínicos com o avanço da idade, de maneira que as búfalas entre oito e dez anos mostraram-se mais suscetíveis à infecção para os segundos autores. Para estes ainda, a predisposição à mastite aumentou nas primeiras lactações e diminuiu posteriormente. KUMAR & SHARMA (2002) encontraram maior incidência de casos infecciosos na terceira lactação. MORONI et al. (2006) também observaram um aumento de freqüências de infecção até a quinta lactação, quando sugeriram que as ocorrências tivessem diminuído em função da seleção das melhores fêmeas do plantel. O inverso disso constataram PREM & BEHRA (1995), JOSHI & GOKHALE (2006), PICCININI et al. (2006). LÁU et al. (1986) relataram que a maioria das búfalas positivas para mastite subclínica encontrava-se entre a quarta e sexta lactação, acreditando-se ser este o período em que as búfalas tornam-se mais susceptíveis às infecções do úbere. OLIVEIRA (1997) discorda da influência do número e do estágio de lactação sobre a ocorrência da infecção mamária nesta espécie.

Para LÁU et al. (1986) a grande maioria das infecções foi encontrada em apenas um quarto do úbere e não em dois ou mais, sem que houvesse predileção pela localização dos mesmos. MORONI et al. (2006) concordaram com a falta de repetições significativas, mas apesar destes autores não terem apresentado explicações para o fato dos casos de infecção terem ocorrido mais nos quartos posteriores, PREM & BEHRA (1995), SINGH et al. (2001), BASTOS (2005) e JOSHI & GOKHALE (2006) sugerem que seja devido à maior exposição desses quartos às fezes e à urina. Quando os tetos bubalinos apresentaram as pontas arredondadas ou em forma de funil, SHUKLA et al. (2005) observaram que a ocorrência de mastite aumentou devido à predisposição às lesões e à retenção de leite, respectivamente.

Para PREM et al. (1995), quando as búfalas pariram na estação das águas apresentaram maior ocorrência de mastites infecciosas. PARANJABE & DAS (1986), observaram que a estação mais úmida das monções determinou a maior prevalência de infecções, particularmente por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e a associação de ambos, e que no inverno e no verão o número de quartos infectados diminuiu. Entre os agentes isolados observaram que os estreptococos foram os principais, em 29,7%, sendo confirmados por SILVA et al. (1996). Fazendo referência a essas épocas do ano, SHUKLA et al. (2005) descreveram 70,27% de infecções durante a estação chuvosa comparada à 64,44% no inverno e 34,28% do verão. SINGH et al. (2001) e JOSHI & GOKHALE (2006) também verificaram a maior predisposição na época do ano de umidade e elevadas temperaturas. No trabalho de MORONI et al. (2006), a CCST média apresentou tendência de ser maior nos meses de inverno e primavera (Dezembro a Maio) que nos meses de verão e outono (Junho a Novembro).

Diante do exposto e considerando que a bubalinocultura leiteira tem assumido crescente importância no cenário nacional, fato este que, aliado a carência de pesquisas sobre métodos diagnósticos a campo e laboratoriais, que sirvam de parâmetros para compor o conjunto de medidas voltadas ao controle e à prevenção de casos de mastite bubalina, principalmente a de origem infecciosa, de modo a proporcionar uma melhoria da qualidade do leite e de seus derivados, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de atingir os objetivos que são apresentados a seguir.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Conhecer a variação do conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite, com a finalidade de avaliar a eficiência do CMT como método auxiliar de diagnóstico da mastite subclínica em búfalas.

3.2. Objetivos específicos

1. Verificar a presença de agentes etiológicos em amostras de leite reagentes e não reagentes ao *California Mastitis Test* (CMT);
2. Observar a ocorrência de mastites clínica e subclínica nas búfalas em lactação com base em resultados de exames de campo e de isolamento microbiano;
3. Identificar os agentes etiológicos isolados de quartos mamários sadios e acometidos por mastite;
4. Verificar as médias de contagem de células somáticas transformadas (CCST) nas amostras de leite provenientes de quartos mamários reagentes e não reagentes ao CMT;
5. Verificar as médias de CCST nas amostras de leite microbiologicamente negativas e positivas;
6. Verificar as médias de CCST nas amostras de leite provenientes de quartos mamários sadios e nas amostras de leite provenientes de quartos mamários afetados pela mastite subclínica;
7. Verificar as médias de CCST nas amostras de leite com resultado negativo ao CMT e isolamento microbiano positivo e nas amostras de leite positivas ao CMT e negativas microbiologicamente.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propriedade e animais

Durante o período de Março a Dezembro de 2005 foram realizadas coletas mensais de amostras de leite de 37 búfalas pertencentes a uma propriedade rural localizada no município de Pompéia, região Oeste do Estado de São Paulo (latitude 22°06'31") sul, longitude 50°10'18" oeste, altitude de 597 metros). No presente trabalho não se realizou o monitoramento das búfalas, uma vez que nem todos os animais foram submetidos a todas as coletas.

O rebanho era constituído por 210 animais das raças Jafarabadi e Murrah, mantidos em regime semi-intensivo de criação, os quais eram identificados individualmente, sendo submetidos a exames semestrais de Tuberculose e Brucelose. As 65 búfalas lactantes eram submetidas à ordenha mecânica duas vezes ao dia com uma produção diária média de 7,8 litros/animal.

O estábulo onde realizavam-se as ordenhas era dividido em quatro seções, separadas por cercas de madeira que delimitavam o local de espera, a área da ordenha propriamente dita, o bezerreiro e a área onde ficava o tanque de expansão.

A ordenha era realizada em estábulo amplo e ventilado, com piso de cimento, água encanada proveniente de mina e cochos de madeira onde era fornecida ração. Assim que o animal entrava na sala para ordenha era oferecida ração no cocho acompanhada da chegada do bezerro para estimulação da descida do leite. Alcançado o objetivo, o filhote era afastado e cada um dos tetos era lavado com água corrente, secado com papel toalha descartável e desinfetado com uma solução de iodo antes da unidade de ordenha ser posicionada. Terminado o processo, a búfala era liberada e saía do estábulo, acompanhada do bezerro, para uma área externa plana, de chão batido, mas livre de umidade.

O leite era retirado em uma ordenhadeira de linha alta que contava com cinco unidades e que levava o leite diretamente ao tanque de expansão onde o resfriamento

era procedido à temperatura de 7°C. O leite era recolhido pelo caminhão tanque do laticínio a cada 48 horas.

4.2. Avaliação dos quartos mamários e coleta e envio de amostras

Durante o período de estudo, um total de 734 quartos mamários foram submetidos, em intervalos mensais, aos exames de inspeção e palpação e posteriormente à pesquisa de alterações macroscópicas e microscópicas da secreção láctea (RADOTISTIS et al., 2000).

Previamente à estimulação da descida de leite pelo bezerro, a inspeção e a palpação dos quartos mamários foram realizadas na medida em que cuidadosa lavagem com água e secagem com papel toalha descartável foram executadas. As características macroscópicas de coloração, consistência, assim como a presença de sangue, grumos ou pus foram avaliadas eliminando-se os três primeiros jatos na caneca de fundo escuro (RADOTISTIS et al., 2000). Na seqüência, foi pesquisada a positividade dos quartos mamários ao *California Mastitis Test*, (SCHALM & NOORLANDER, 1957), anotando-se todos os resultados em fichas protocolares adequadas. Em cada coleta todos os resultados e as informações individuais quanto ao estágio de lactação em que as búfalas se encontravam foram anotados em fichas adequadas.

Independentemente de apresentar alterações em qualquer uma das características avaliadas, cada teto foi imediatamente lavado com água e seu óstio foi desinfetado com algodão embebido em álcool iodado. Dessa maneira foram utilizados os jatos iniciais da ordenha. Primeiramente, foram coletadas em frascos de vidro esterilizados e identificados amostras de aproximados 10 mL de leite para exames microbiológicos. Essas amostras foram enviadas ao laboratório sob temperatura de refrigeração em caixas térmicas de material isotérmico (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1987).

Para a contagem de células somáticas foram coletados, logo em seguida, 50 mL de leite em frascos plásticos específicos devidamente identificados, contendo dicromato

de potássio (1%) como conservante, sendo, em seguida, transportados em temperatura ambiente até o Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Mastites do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP em Botucatu (ANDREWS et al., 1983; EDMONDSON, 1996; CANAES, 2004).

4.3. Procedimentos laboratoriais

4.3.1. Procedimentos de análise microbiológica

O exame microbiológico foi realizado semeando-se 10 µL de cada amostra de leite em placas contendo Agar Base (Oxoid®) enriquecido com 5% de sangue ovino e Agar MacConkey (Difco®). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 72 horas e o crescimento microbiano foi observado a cada 24 horas. A identificação dos agentes isolados foi realizada segundo QUINN et al. (1994). A identificação dos microrganismos isolados teve início com a avaliação do tempo de crescimento das colônias, de suas características macroscópicas como coloração, aspecto liso ou rugoso, seco ou úmido, presença e tipo de hemólise e, quando necessário, odor específico, seguindo-se a avaliação dos aspectos tintoriais e morfológicos, assim como das características bioquímicas pertinentes.

Para identificação dos *Staphylococcus* spp., a partir das colônias suspeitas de tamanho pequeno a médio, coloração branca a amarelada, aspecto úmido, com ou sem hemólise, isoladas apenas no meio de agar sangue, realizou-se o esfregaço em lâmina, corando-o pelo método de Gram. Em se tratando de cocos Gram positivos, iniciou-se a diferenciação de outras bactérias estruturalmente semelhantes com os testes da catalase, de Oxidação-Fermentação (OF), da produção de oxidase e de sensibilidade aos discos de bacitracina (disco de 0,04 unidades) e de furazolidona (disco de 100µg). Assim, bactérias sob a forma de cocos Gram positivos, arranjados em agrupamentos irregulares, catalase positivos, fermentativos ao teste de OF, oxidase negativos, resistentes à bacitracina e sensíveis à furazolidona foram classificadas como

Staphylococcus spp. Conforme a produção da coagulase em tubos, eles foram diferenciados em coagulase positivos ou coagulase negativos.

Quando os cocos Gram positivos e catalase positivos agruparam-se em tétrades, não produziram coagulase, foram positivos para oxidase, sensíveis à bacitracina, resistentes à furazolidona e oxidativos no teste de OF, classificaram-se como *Micrococcus* spp.

Os *Streptococcus* spp. foram identificados como sendo: cocos Gram positivos, apresentados em forma de cadeias, isolados como colônias delicadas, de aspecto úmido, apenas em agar sangue de ovino, entre 24 e 48 horas de incubação, não produtores de catalase, coagulase e nem oxidase, fermentativos no teste de OF, resistentes à bacitracina e sensíveis à furazolidona.

Os agentes do gênero *Corynebacterium* spp. foram classificados à partir das colônias suspeitas crescidas apenas em agar sangue de ovino entre 24 e 48 horas. Tratavam-se de pequenos bastonetes Gram positivos, pleomórficos, dispostos tipicamente em paliçadas ou em ângulos retos entre si. Nos testes de catalase e de glicose foram positivos e mostraram-se fermentativos ao teste de OF bem como negativos à oxidase.

A identificação dos *Rhodococcus equi* se baseou no crescimento colonial geralmente às 24 horas de colônias levemente rosadas, por apresentarem estruturas Gram positivas em forma de delicados bastonetes juntamente com cocos no mesmo esfregaço, por não terem crescido em agar MacConkey, não terem reagido ao teste de OF e nem à glicose, e por terem se mostrado positivos aos testes da catalase e CAMP, no qual deixaram evidente uma forma típica de hemólise completa contra a linha onde foi semeado o *Staphylococcus aureus*.

Os *Arcanobacterium pyogenes*, anteriormente denominados *Actinomyces pyogenes*, foram os bastonetes Gram positivos, corineformes cujo crescimento, sob a forma de colônias minúsculas após 48 horas de incubação, foi precedido pelo aparecimento de uma clara zona de hemólise na linha de semeadura no agar sangue. Foram negativos para a catalase e para oxidase, fermentativos no teste de OF e intensificaram a hemólise beta do *S. aureus* no CAMP test.

A *Nocardia asteroides* foi representada por pequenas colônias brancas, de aspecto seco firmemente aderidas à superfície do agar sangue. Os esfregaços evidenciaram longos filamentos Gram positivos característicos do gênero.

Colônias pequenas, lisas de coloração azul-esverdeada rodeadas por uma estreita zona de hemólise completa, isoladas em agar sangue de ovino entre 24 e 48 horas levaram à suspeita de serem *Listeria monocytogenes*. O esfregaço corado revelou pequenos cocobacilos Gram positivos que apresentaram resultados positivos para os testes de hidrólise da esculina, da catalase e o CAMP empregando *S. aureus*, negativos à oxidase e fermentativos no OF.

Os *Lactobacillus* spp. foram longos bacilos Gram positivos dispostos em cadeias, crescidos em agar sangue, catalase e oxidase negativos, fermentativos no OF e que no meio de Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) não produziram H₂S, mas produziram gás ao converterem a glicose.

Os *Bacillus* spp. foram observados como bastonetes Gram positivos crescidos em 24 horas em colônias grandes de bordas lisas ou irregulares, de aspecto úmido, em alguns casos rodeadas por hemólise completa em áreas menores ou maiores. Foram submetidos a uma coloração à base de verde de malaquita 5% e safranina aquosa 5% onde deixaram evidentes os esporos na porção média da estrutura. Foram positivos à catalase, negativos à oxidase e fermentativos no OF.

Os microrganismos que apresentaram crescimento em 24h em Agar MacConkey e na coloração de Gram apresentaram formas de bacilos ou cocobacilos Gram-negativos foram submetidos inicialmente às provas de catalase e oxidase, onde foram respectivamente positivos e negativos. Empregou-se também o meio de OF e a série bioquímicas para enterobactérias: testes de motilidade, indol, lisina, citrato, fenilalanina e urease. Amostras das colônias também foram inoculadas no agar TSI para verificar seu comportamento sobre a lactose, a glicose, a produção de H₂S e de gás. As amostras suspeitas de tratarem-se de *Escherichia coli* foram repicadas para o agar eosina azul de metileno. Assim, foram identificados *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter diversus* e *E. coli*.

O *Alcaligenes faecalis* foi identificado por ter crescido em agar sangue de ovino e em agar MacConkey, apresentando-se como pequenos bacilos Gram negativos, positivos à catalase, à oxidase e ao citrato, negativos à urease e não fermentativos e nem oxidativos no OF.

Os *Actinobacillus* spp. foram os bacilos Gram negativos, isolados do agar sangue de ovino e do agar MacConkey onde fermentaram a lactose, foram uréia e oxidase positivos.

Foram considerados *Pasteurella* spp. os cocobacilos Gram negativos isolados em colônias acinzentadas, muitas vezes mucóides, em agar sangue entre 24 e 48 horas. Como método auxiliar, esfregaços foram corados pelo método de Giemsa para verificar a presença de coloração bipolar. Foram catalase e oxidase positivas, e fermentativos no teste de OF.

4.3.2. Contagem de células somáticas pelo método automático com contadores eletrônicos infravermelhos

A contagem foi realizada com o aparelho Somacount 300 (Bentley Instruments Inc., Minnesota, EUA). Este aparelho usa a citometria de fluxo com laser para determinar o conteúdo de células somáticas na amostra de leite. Para isso um pequeno volume de leite é recolhido automaticamente pelo aparelho e misturado com uma solução de corante fluorescente, que dispersa os glóbulos de gordura ao mesmo tempo em que cora o DNA das células somáticas. Uma alíquota da amostra corada é injetada em um fluxo laminar e as células são separadas antes de serem expostas a um feixe de raio laser que estimula o corante e as torna fluorescentes. Através de uma série de lentes, esses pulsos fluorescentes são direcionados a um fotomultiplicador a fim de serem convertidos em pulsos elétricos e posteriormente traduzidos em contagem de células somáticas por mL de leite.

4.4. Índices pluviométricos

Com a finalidade de observar a influência dos índices pluviométricos sobre a ocorrência de isolamentos microbianos tanto sobre o aspecto positividade e negatividade quanto sobre o aspecto da origem ambiental ou infecciosa do agente encontrado, considerou-se a seguinte classificação de período de seca e de águas: a estação das águas incluiu as coletas realizadas nos meses de Março, Outubro, Novembro e Dezembro de 2005; e a estação da seca incluiu Abril, Maio, Junho, Julho, Agosto e Setembro de 2005. Os índices pluviométricos mensais foram: 122,7 mm em Março, 157,4 mm em Outubro, 98,1 mm em Novembro e 156,1 mm em Dezembro; e no outro intervalo foram 41,7 mm em Abril, 37,7 mm em Maio, 63,8 em Junho, 10,2 mm em Julho, 33,9 mm em Agosto e 112,7 mm em Setembro (CATI, 2005).

4.5. Análise estatística

Foi realizado o procedimento PRO UNIVARIATE para testar a distribuição normal da contagem de células somáticas, encontrando-se que, em função da falta de homogeneidade de variâncias (Figura 1), esta contagem foi submetida à transformação logarítmica $\log_2(\text{CCS}/100)+3$, proposta por ALI & SHOOK (1980) (Figura 2).

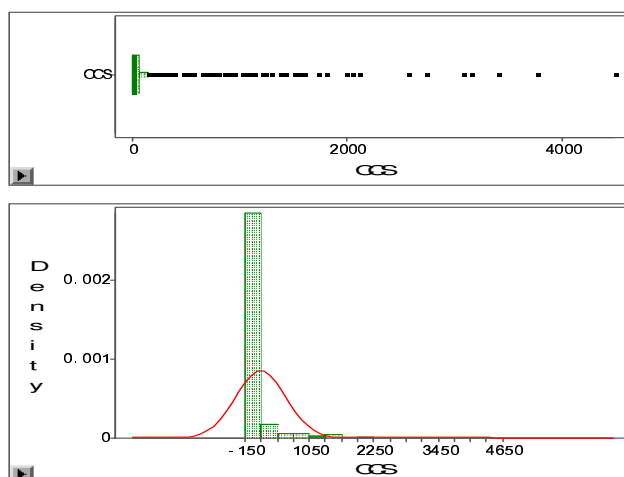


Figura 1. Distribuição das contagens de células somáticas observadas em amostras de leite de 734 quartos mamários de fêmeas bubalinas analisadas no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007)

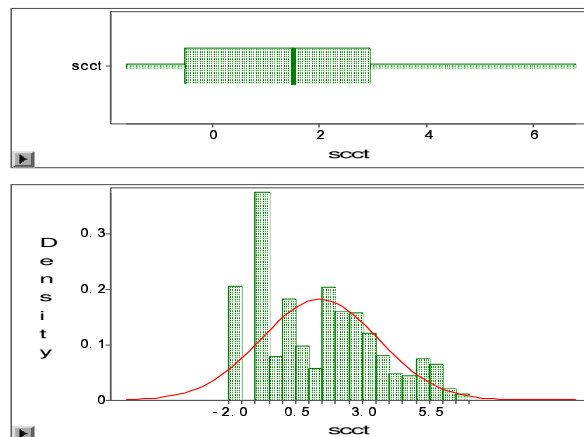


Figura 2. Distribuição das contagens de células somáticas transformadas observadas em amostras de leite de 734 quartos mamários de fêmeas bubalinas analisadas no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007)

Foram realizadas: análises de frequência (PROC FREQ) para estabelecer frequência de ocorrência dos patógenos causadores de mastite; teste (χ^2) qui-quadrado (PROC FREQ/chisq) para determinar a diferença entre as frequências análises de variância (PROC GLM) para a contagem de células somáticas transformada; teste de Tukey para estimar a diferença entre as médias de CCST; cálculo da correlação de Pearson (PROC CORR) para verificar a correlação entre o CMT e a CCST. Todos os procedimentos utilizados pertenceram ao software estatístico SAS (1999).

O modelo utilizado foi para cada uma das análises é descrito por:

$$y = X\beta + Za + Wc + e$$

Onde,

y = é o vetor das variáveis dependentes (CCST);

X = é a matriz de incidência dos efeitos fixos;

β = é o vetor de efeitos fixos (fase de lactação, estação do ano, dias em lactação, localização do quarto mamário);

Z = é a matriz de incidência dos efeitos do animal;

a = é o vetor dos efeitos aleatórios do animal;

W = é a matriz de incidência dos efeitos das medidas repetidas do mesmo quarto;

c = é o vetor dos efeitos permanentes de medias repetidas do mesmo quarto;

e = é o vetor dos erros aleatórios associados a cada observação.

V. RESULTADOS

Entre as 735 amostras de leite analisadas no período de março a dezembro de 2005, 192 (26,12%) foram colhidas no período inicial, limitado entre o parto e o segundo mês de lactação (0 a 60 dias pós-parto); 334 (45,44%) no meio da lactação, entre o terceiro e sexto meses (61 a 180 dias pós-parto); e 209 (28,44%) no final, entre o sétimo e o nono meses (181 a 270 dias pós-parto). Quanto à época do ano em que tais amostras foram colhidas, 482 (65,58%) se originaram na estação da seca e 253 (34,42%) nas águas.

Os exames de palpação, inspeção e da caneca de fundo escuro revelaram alterações de coloração e consistência, bem como a presença de pequenos grumos, em apenas 01 (0,14%) quarto mamário. Este caso ocorreu no primeiro mês de lactação, representando 0,52% das 192 amostras processadas nessa fase e 0,21% das 482 amostras da estação da seca. Por outro lado, dos 734 quartos aparentemente saudáveis submetidos ao CMT, 227 (30,93%) apresentaram reações positivas em diferentes intensidades e 507 (69,07%) mostraram-se negativos (Figura 1).

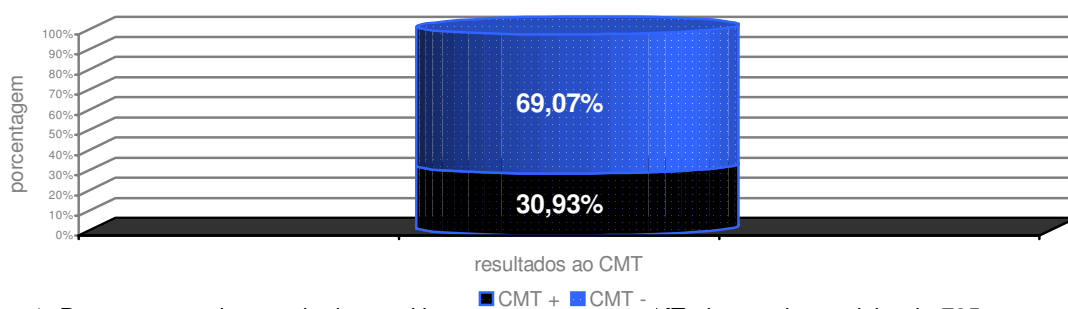


Figura 1. Percentagens dos resultados positivos e negativos do CMT observados no leite de 735 quartos mamários de fêmeas bubalinas analisados no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

A ocorrência dos 227 resultados positivos ao CMT de acordo com a intensidade da reação observada revelou 73 (32,16%), 53 (23,35%) e 101 (44,49%) com reações correspondentes a 1+, 2+ e 3+, respectivamente (Figura 2).

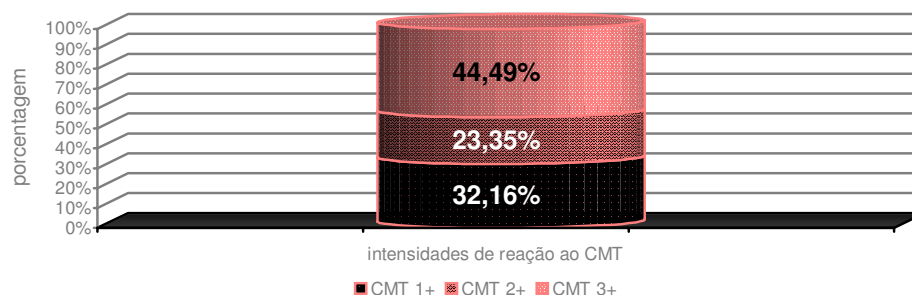


Figura 2. Porcentagens dos 227 resultados positivos do CMT distribuídos de acordo com a intensidade das reações (1+, 2+ e 3+) encontradas na análise do leite dos quartos mamários de búfalas leiteiras no intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Considerando-se as fases de lactação, entre as 191 amostras clinicamente normais coletadas na fase inicial, o CMT foi positivo em 44 (23,04%) e negativo em 147 (76,96%). Das 334 amostras analisadas na fase média, o teste mostrou-se positivo em 106 (31,74%) e negativo em 228 (68,26%). Na fase final, os resultados foram respectivamente positivos em 77 (36,84%) e negativos em 132 (63,16%) (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Porcentagens de amostras de leite positivas e negativas ao CMT na análise dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Fases da lactação	Quartos positivos ao CMT		Quartos negativos ao CMT		TOTAL
	n	%	n	%	n
Inicial	44	23,04	147	76,96	191
Média	106	31,74	228	68,26	334
Final	77	36,84	132	63,16	209
TOTAL					734

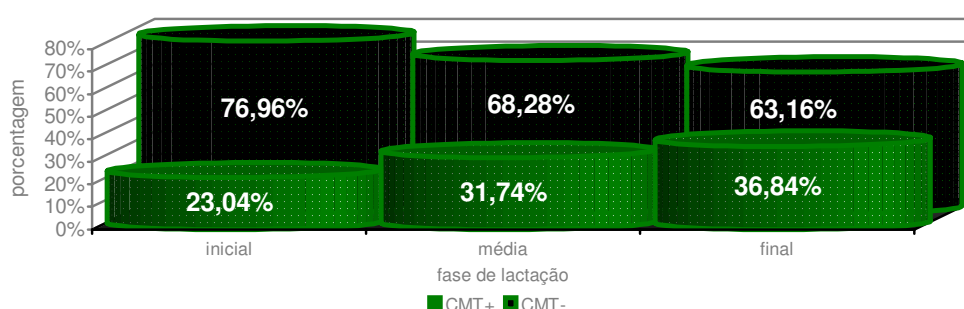


Figura 3. Porcentagens dos resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise do leite dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Na fase inicial, entre as 44 reações CMT positivas, 15 amostras (34,09%) tiveram reação 1+; 14 amostras (31,82%), a reação 2+; e 15 amostras (34,09%) reagiram com 3+. Nas fases média e final da lactação predominaram as reações 3+ em respectivamente 44,34% e 50,65% das amostras (Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Fases da lactação	Intensidades de reação ao CMT						TOTAL
	1+		2+		3+		n
	n	%	n	%	n	%	
Inicial	15	34,09	14	31,82	15	34,09	44
Média	37	34,91	22	20,75	47	44,34	106
Final	21	27,27	17	22,08	39	50,65	77
TOTAL	73	32,16	53	23,35	101	44,49	227

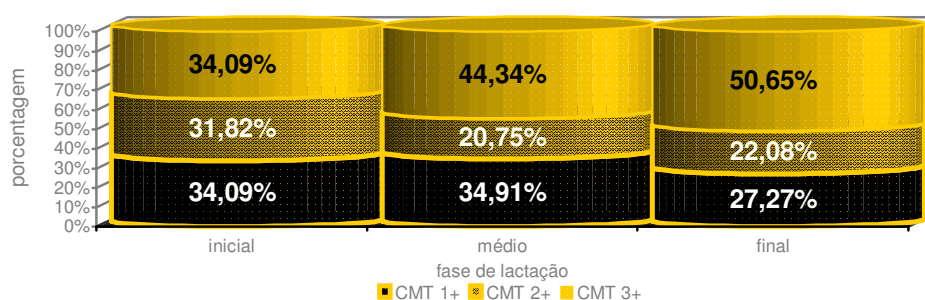


Figura 4. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Com relação à estação do ano em que as amostras foram coletadas, observou-se que das 481 amostras de leite de quartos clinicamente normais na estação da seca, CMT foi positivo em 155 (32,22%) e negativo em 326 (67,78%). Por outro lado, entre as 253 analisadas na época das águas, o CMT mostrou-se positivo em 72 (28,46%) e negativo em 181 (71,54%) (Tabela 3 e Figura 5).

Tabela 3. Porcentagens de amostras de leite com resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Estação do ano	Quartos positivos ao CMT		Quartos negativos ao CMT		TOTAL
	n	%	n	%	n
Seca	155	32,22	326	67,78	481
Águas	72	28,46	181	71,54	253
TOTAL	227	30,93	507	69,07	734

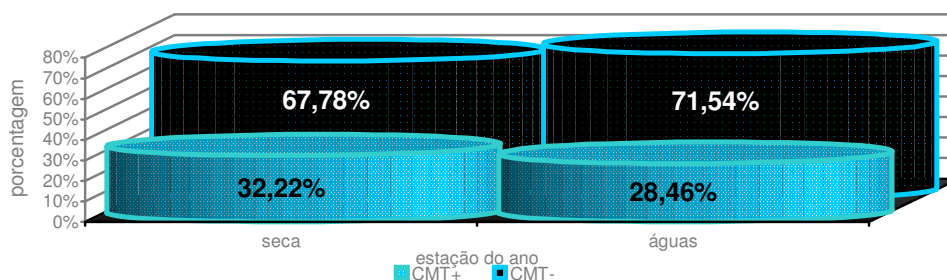


Figura 5. Porcentagens dos resultados positivos e negativos do CMT encontrados na análise do leite dos 734 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Os dados da Tabela 4 mostram que na estação seca houve predomínio da reação do CMT com intensidade 3+ (44,52%), seguida por 1+ (32,9%) e 2+ (22,58%), enquanto que na estação das águas, as intensidades observadas foram de 3+ (44,44%), 1+ (30,56%) e 2+ (25%) (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Estação do ano	Intensidades de reação ao CMT						TOTAL
	1+		2+		3+		n
	n	%	n	%	n	%	
Seca	51	32,9	35	22,58	69	44,52	155
Águas	22	30,56	18	25	32	44,44	72
TOTAL	73	32,16	53	23,25	101	13,76	227

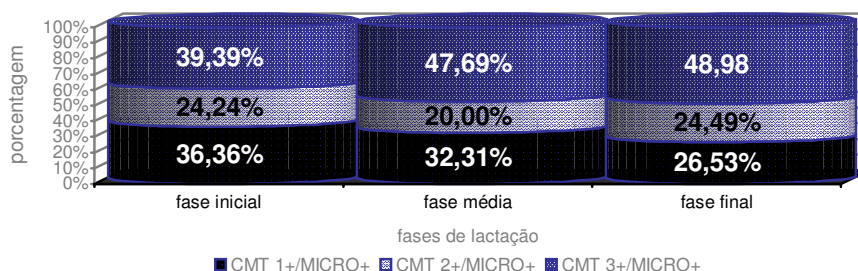


Figura 6. Porcentagens das intensidades de reação ao CMT (1+, 2+ e 3+) encontradas na avaliação do leite de 227 quartos mamários de búfalas leiteiras durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Nas análises microbiológicas das 735 amostras de leite, 27 (3,67%) apresentaram contaminação externa, motivo pelo qual todas as considerações que envolveram resultados microbiológicos se basearam em 708 amostras. Assim sendo, entre as amostras obtidas nas diversas fases de lactação, observou-se que 180 (93,75%) não sofreram contaminação na fase inicial, 332 (99,4%) na média e 196

(93,78%) na final. Do mesmo modo, verificou-se que na estação da seca e das águas, houve a ocorrência de 479 (99,38%) amostras e 229 (90,51%) amostras não contaminadas, respectivamente.

Entre as 708 amostras submetidas ao exame microbiológico, 429 (60,59%) foram positivas. A avaliação microbiológica de rotina da única amostra de leite que apresentou alterações de consistência e coloração entre as 708, permitiu o isolamento de microrganismos (0,14%). Os exames bacteriológicos de 707 amostras normais apresentaram resultados positivos 428 (60,54%) e negativos em 279 (39,46%) (Figura 7).

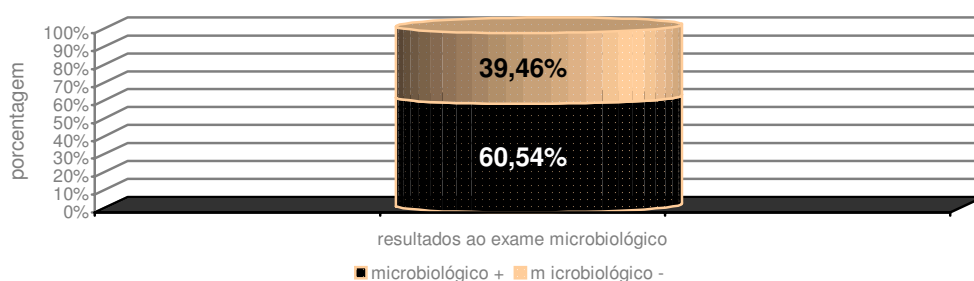


Figura 7. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente saudáveis durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

A amostra com características de mastite clínica e isolamento bacteriano positivo representou 0,56% das amostras microbiologicamente viáveis da fase inicial da lactação. Por sua vez, os resultados negativos e positivos das 179 restantes foram, 71 (39,66%) e 108 (60,34%), respectivamente. Na fase média, 140 (42,17%) mostraram-se negativas e 192 (57,83%) positivas, enquanto que entre as amostras analisadas no final do período de lactação, 68 (34,69%) e 128 (65,31%) foram negativas e positivas, respectivamente (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Fase de lactação	Exame microbiológico				TOTAL
	positivo		negativo		
	n	%	n	%	
Inicial	108	60,34	71	39,66	179
Média	192	57,93	140	42,17	332
Final	128	65,31	68	34,69	196
TOTAL	428	60,54	279	39,46	707

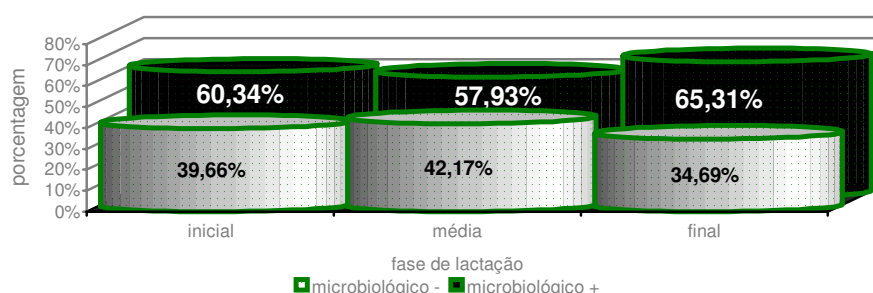


Figura 8. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

A amostra de leite com alterações macroscópicas e com exame microbiológico positivo representou 0,21% das 479 amostras coletadas na época da seca. Por outro lado, entre os 478 quartos clinicamente sadios, 283 (59,21%) amostras de leite foram positivas ao isolamento e 195 (40,79%) foram negativas. Durante a estação das águas, das 229 amostras analisadas, 145 (63,32%) e 84 (36,68%) mostraram-se, positivas e negativas, respectivamente (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Estação do ano	Exame microbiológico				TOTAL
	positivo		negativo		
	n	%	n	%	
Seca	283	59,21	195	40,79	478
Águas	145	63,32	84	36,68	229
TOTAL	428	60,54	279	39,46	707

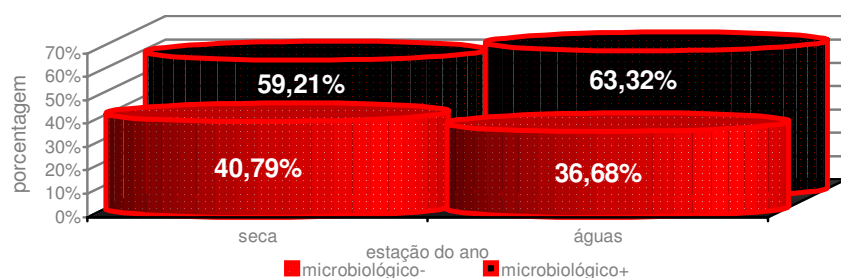


Figura 9. Porcentagens dos resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos das 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários sem alterações clínicas durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Com a identificação dos agentes microbianos isolados detectou-se na amostra de leite com alterações clínicas da secreção a associação de *Corynebacterium* spp., *Morganella morganii* e *Enterobacter aerogenes*. Dentre os outros 428 exames com resultados positivos, foram encontradas 579 isolamentos de 19 gêneros bacterianos diferentes, tanto em culturas puras quanto em diferentes associações (Tabela 3 e Figura 5). Nestas, os microrganismos mais freqüentes foram em ordem decrescente: 276 (47,67%) *Corynebacterium* spp., 97 (16,75%) *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN) e 41 (7,08%) *Micrococcus* spp. (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente saudáveis, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Corynebacterium</i> spp.	276	47,67
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativos (SCN)	97	16,75
<i>Micrococcus</i> spp.	41	7,08
<i>Rhodococcus equi</i>	29	5,01
<i>Streptococcus</i> spp.	27	4,66
<i>Listeria</i> spp.	27	4,66
<i>Bacillus</i> spp.	22	3,80
<i>Lactobacillus</i> spp.	15	2,59
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positivos (SCP)	14	2,42
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	12	2,07
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	0,86
<i>Morganella morganii</i>	4	0,69
<i>Actinobacillus</i> spp.	2	0,35
<i>Escherichia coli</i>	2	0,35
<i>Pasteurella</i> spp.	2	0,35
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0,17
<i>Citrobacter diversus</i>	1	0,17
<i>Nocardia asteroides</i>	1	0,17
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,17
TOTAL	579	

Em todas as oportunidades em que foi identificado, o *Corynebacterium* spp. foi isolado principalmente em cultura pura (65,58%) (Tabela 8), o mesmo acontecendo com os SCN (48,45%) (Tabela 9) e com os *Micrococcus* spp. (56,10%) (Tabela 10). As associações encontradas para cada um dos demais gêneros podem ser observadas no Anexo I.

Tabela 8. Porcentagens dos 276 isolados de *Corynebacterium* spp. conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n de isolamentos	%
<i>Corynebacterium</i> spp.	181	65,58
<i>Corynebacterium</i> spp. + SCN	25	9,06
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	14	5,07
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Rhodococcus equi</i>	9	3,26
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	9	3,26
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Lactobacillus</i> spp.	5	1,81
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. pyogenes</i>	5	1,81
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Micrococcus</i> spp.	5	1,81
<i>Corynebacterium</i> spp. + SCP	4	1,45
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	4	1,45
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>E. aerogenes</i>	3	1,09
<i>Corynebacterium</i> spp. + SCN + <i>Listeria</i> spp.	2	0,72
<i>Corynebacterium</i> spp. + SCN + SCP	2	0,72
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Pasteurella</i> spp.	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>C. diversus</i>	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. pyogenes</i> + <i>Streptococcus</i> spp.	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Actinobacillus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. pyogenes</i> + SCN	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp. + <i>Micrococcus</i> spp.	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. faecalis</i> + <i>E. aerogenes</i>	1	0,36
<i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	1	0,36
TOTAL	276	

Tabela 9. Porcentagens dos 97 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
SCN	47	48,45
SCN + <i>Corynebacterium</i> spp.	24	24,74
SCN + <i>Micrococcus</i> spp.	3	3,09
SCN + <i>A. pyogenes</i>	2	2,06
SCN + <i>Streptococcus</i> spp.	2	2,06
SCN + SCP	2	2,06
SCN + <i>Escherichia coli</i>	2	2,06
SCN + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	2	2,06
SCN + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	1	1,03
SCN + <i>Rhodococcus equi</i>	1	1,03
SCN + <i>N. asteroides</i>	1	1,03
SCN + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>R. equi</i>	1	1,03
SCN + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. pyogenes</i>	1	1,03
SCN + <i>Micrococcus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	1	1,03
SCN + <i>Micrococcus</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	1	1,03
SCN + <i>Micrococcus</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	1	1,03
SCN + <i>R. equi</i> + <i>A. pyogenes</i>	1	1,03
SCN + <i>Streptococcus</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	1	1,03
SCN + SCP + <i>A. pyogenes</i>	1	1,03
SCN + SCP + <i>Streptococcus</i> spp.	1	1,03
SCN + SCP + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	1,03
TOTAL	97	

Tabela 10. Porcentagens dos 41 isolados de *Micrococcus* spp. conforme seu isolamento em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios, durante o intervalo de Março a Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Micrococcus</i> spp.	23	56,10
<i>Micrococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	12,20
<i>Micrococcus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	4	9,76
<i>Micrococcus</i> spp. + SCN	3	7,32
<i>Micrococcus</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	2	4,88
<i>Micrococcus</i> spp. + SCN + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	2,44
<i>Micrococcus</i> spp. + SCN + <i>Bacillus</i> spp.	1	2,44
<i>Micrococcus</i> spp. + SCN + <i>Streptococcus</i> spp.	1	2,44
<i>Micrococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	1	2,44
TOTAL	41	

Quando os 579 microrganismos isolados pertencentes a 19 gêneros foram distribuídos entre as três fases de lactação, 251 (43,35%) se concentraram nas 192 amostras da fase média. Nas 108 amostras da fase inicial isolou-se 166 (28,67%) bactérias e nas 128 da fase final, 162 (27,98%). Independente da fase considerada, notou-se a constante predominância do *Corynebacterium* spp., que representou 30,72% dos agentes isolados na fase inicial, 49,40% daqueles da fase média e 62,35% da fase final (Tabela 11).

Tabela 11. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios durante as fases inicial, média e final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	Fase de lactação					
	Inicial		Média		Final	
	n	%	n	%	n	%
<i>Actinobacillus</i> spp.	2	1,20	-	-	-	-
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	-	-	8	3,19	4	2,47
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0,6	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	15	9,04	7	2,79	-	-
<i>Citrobacter diversus</i>	-	-	1	0,4	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	51	30,72	124	49,40	101	62,35
<i>Escherichia coli</i>	2	1,2	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	3,01	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	2	1,2	13	5,18	-	-
<i>Listeria</i> spp.	11	6,63	16	6,37	-	-
<i>Micrococcus</i> spp.	11	6,63	23	9,16	7	4,32
<i>Morganella morganii</i>	-	-	4	1,59	-	-
<i>Nocardia asteroides</i>	1	0,6	-	-	-	-
<i>Pasteurella</i> spp.	2	1,2	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	7	4,22	7	2,79	15	9,26
SCN	41	24,7	31	12,35	25	14,43
SCP	7	4,22	3	1,2	4	2,47
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,6	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	7	4,22	14	5,58	6	3,7
TOTAL	166	28,67	251	43,35	162	27,98

-: não houve crescimento

Quando se considerou os 579 isolamentos divididos entre época de seca e de água, 385 (66,49%) cresceram nas 283 amostras microbiológico-positivas da estação da seca. Nelas, os microrganismos mais prevalentes foram: *Corynebacterium* spp. (46,49%), SCN (15,58%) e *Micrococcus* spp. (9,35%). Foram isolados 194 (33,51%) microrganismos nas 145 amostras com microrganismos originadas na estação das águas, onde predominaram *Corynebacterium* spp. com 50,00%, SCN com 19,07% e *Rhodococcus equi* com 12,89% (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagens dos 579 microrganismos pertencentes a 19 gêneros diferentes, isolados em exames microbiológicos positivos de 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários considerados clinicamente sadios entre as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	Estação do ano			
	Seca		Águas	
	n	%	n	%
<i>Actinobacillus</i> spp.	-	-	2	1,03
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	11	2,86	1	0,52
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	1	0,52
<i>Bacillus</i> spp.	20	5,19	2	1,03
<i>Citrobacter diversus</i>	1	0,26	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	179	46,49	97	50,00
<i>Escherichia coli</i>	2	0,52	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0,78	2	1,03
<i>Lactobacillus</i> spp.	13	3,38	2	1,03
<i>Listeria</i> spp.	25	6,49	2	1,03
<i>Micrococcus</i> spp.	36	9,35	5	2,58
<i>Morganella morganii</i>	4	1,04	-	-
<i>Nocardia asteroides</i>	1	0,26	-	-
<i>Pasteurella</i> spp.	-	-	2	1,03
<i>Rhodococcus equi</i>	4	1,04	25	12,89
SCN	60	15,58	37	19,07
SCP	7	1,82	7	3,61
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	1	0,52
<i>Streptococcus</i> spp.	19	4,94	8	4,12
TOTAL	385	66,49	194	33,51

-: não houve crescimento

Entre as 734 amostras clinicamente sadias encontradas ao longo do intervalo de estudo, a contagem automática de células somáticas foi realizada em 668, que levaram a uma CCST média igual a 1,87, independente do resultado do CMT, da presença ou ausência de microrganismos nas amostras, da fase de lactação e da estação do ano em que foram coletadas (Tabela 13).

Tabela 13. Média, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
CCST	668	1,87 ± 0,45	1,58	5,58

Quando se considerou o efeito das diferentes fases de lactação, as CCST médias foram: 1,81 no início, 1,87 na média e 1,92 na final (Tabela 14).

Tabela 14. Médias, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios durante as fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Fase da lactação	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Inicial	CCST	147	1,81 ± 0,34 A	1,58	4,34
Média	CCST	324	1,87 ± 0,48 A	1,58	5,58
Final	CCST	197	1,92 ± 0,45 A	1,58	4,85

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Por fim, quando os resultados foram classificados apenas com base na estação do ano em que as amostras de leite foram coletadas, as CCSTs médias da estação das águas e a seca foram as mesmas, 1,87 (Tabela 15), confirmando o resultado da análise de variância que demonstrou a ausência de influência das estações do ano sobre a CCST.

Tabela 15. Médias, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da Contagem de Células Somáticas Transformadas (CCST) em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios durante as estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Estação do ano	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Seca	SCST	441	1,87 ± 0,44 A	1,58	5,58
Águas	SCST	227	1,87 ± 0,45 A	1,58	4,84

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Para o estudo da associação entre resultados dos exames microbiológicos e do CMT foram empregadas as 707 amostras que não sofreram contaminação, independentemente da fase de lactação ou da estação do ano em que as amostras foram coletadas. De acordo com as condições de isolamento microbiológico oferecidas no presente estudo, 428 (60,54%) apresentavam resultados positivos e 279 (39,46%),

negativos. Quanto aos resultados do CMT, observou-se que 488 (69,02%) amostras foram negativas e 219 (30,98%) positivas (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 707 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	147	72	219
Negativo	281	207	488
TOTAL	428	279	707

Com base no Quadro 1, entre os 219 resultados CMT positivos, obtidos ao longo do período de Março a Dezembro de 2005, a presença de microrganismos foi confirmada em 147 (67,12%). Assim, a confirmação microbiológica dos resultados CMT positivos revelou que, entre os 734 quartos considerados clinicamente sadios, a prevalência de mastite subclínica foi 20,03%. Nos demais 72 (32,88%) resultados CMT positivos, não foram encontrados microrganismos. Dos 488 resultados CMT negativos, 207 (42,42%) mostraram-se isentos de microrganismos, de acordo com a metodologia empregada. Os outros 281 (57,58%) resultados CMT negativos mostraram-se portadores de agentes bacterianos e, nestes, o crescimento puro de *Corynebacterium* spp. foi observado em 116 (41,28%) (Figura 10).

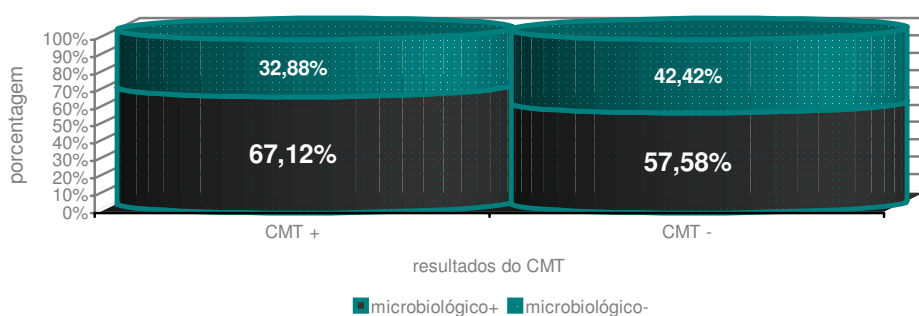


Figura 10. Distribuição, em porcentagem, dos resultados microbiológicos positivos e negativos entre as 219 amostras de leite positivas e as 488 amostras negativas ao CMT coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Entre os 147 resultados CMT positivos que tiveram isolamento bacteriano, a maior confirmação microbiológica (46,26%) foi observada principalmente entre as amostras que apresentaram reação com intensidade de 3+ (Tabela 16 e Figura 11). O

Corynebacterium spp. em crescimento puro, foi o principal isolado: em 47,83% das reações 1+, 39,39% entre as 2+ e 39,71% das 3+.

Tabela 16. Distribuição, em porcentagem, das diferentes intensidades de reação (1+, 2+ e 3+) dos 147 resultados positivos do CMT de acordo com a confirmação microbiológica em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Intensidade do resultado CMT+	Exame microbiológico positivo	
	n	%
1+	46	31,29
2+	33	22,45
3+	68	46,26
TOTAL	147	

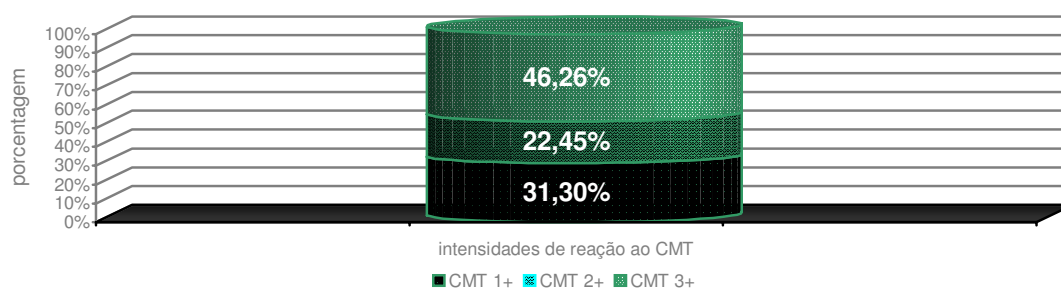


Figura 11. Distribuição, em porcentagem, das diferentes intensidades de reação (1+, 2+ e 3+) dos 147 resultados positivos do CMT, de acordo com a confirmação microbiológica em amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Nas diferentes fases de lactação, independente da estação do ano em que as amostras foram coletadas, a associação entre resultados de exames microbiológicos e do CMT foi realizada em 179 amostras na fase inicial, 332 na fase média e 196 na final.

Na fase inicial da lactação, entre os 41 resultados CMT rotulados como positivos, a presença de agentes infecciosos foi confirmada em 80,49% (Quadro 2, Figura 12). O mesmo aconteceu em 62,50% das 104 reações CMT positivas da fase média (Quadro 3, Figura 18) e em 66,22% dos 74 resultados CMT positivos na fase final da lactação (Quadro 4, Figura 12). Dessa maneira, a prevalência dos casos de mastite subclínica entre todos os quartos analisados nas respectivas fases de lactação, considerando-se a coincidência dos resultados foi: 18,44%, 19,58% e 25,0%.

Quadro 2. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 179 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase inicial de lactação (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	33	8	41
Negativo	75	63	138
TOTAL	108	71	179

Quadro 3. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 332 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase média de lactação (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	65	39	104
Negativo	127	101	228
TOTAL	192	140	332

Quadro 4. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 196 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na fase final de lactação (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	49	25	74
Negativo	79	43	122
TOTAL	128	68	196

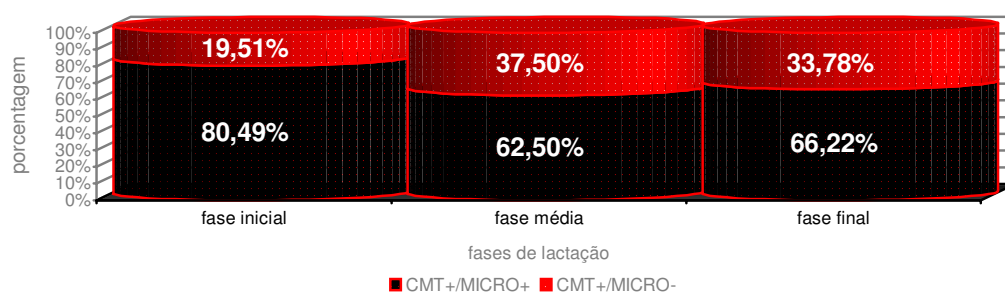


Figura 12. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite positivas (+) ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Os resultados negativos do CMT encontrados nas fases inicial, média e final de lactação tiveram confirmação microbiológica negativa em respectivamente: 45,65% das vezes (Quadro 2 e Figura 13), 44,30% (Quadro 3 e Figura 13) e 35,25% (Quadro 4 e Figura 13). No restante das amostras, ainda que houvessem sido classificadas como negativas, foram isoladas bactérias.

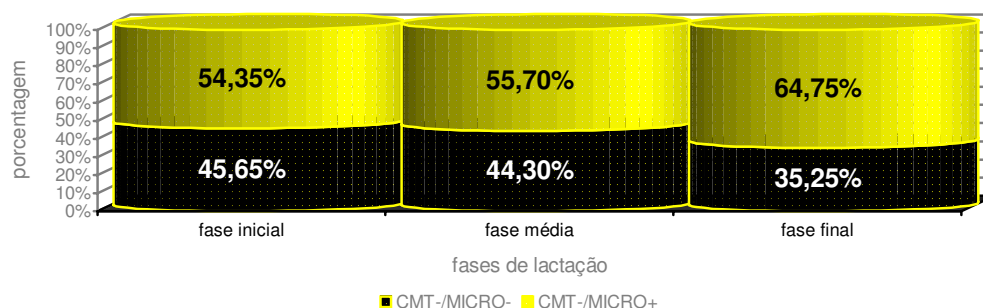


Figura 13. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite negativas (-) ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Relacionando-se os resultados positivos do exame microbiológico e as diferentes intensidades da reação positiva ao CMT, observou-se que entre os 33 resultados CMT positivos e microbiológico positivos da fase inicial da lactação a correspondência foi semelhante para as intensidades 1+ e 3+ e menor para 2+. Já nas fases média e final, a confirmação microbiológica foi observada principalmente quando a reação apresentou a intensidade 3+, respectivamente 47,69% e 48,98% das amostras CMT e microbiológico-positivas (Tabela 17 e Figura 14).

Tabela 17. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT em amostras analisadas nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Intensidade do resultado CMT+	Fase de lactação	n	%
1+	Inicial	12	36,36
	Média	21	32,31
	Final	13	26,53
2+	Inicial	8	24,24
	Média	13	20,00
	Final	12	24,49
3+	Inicial	13	39,39
	Média	31	47,69
	Final	24	48,98

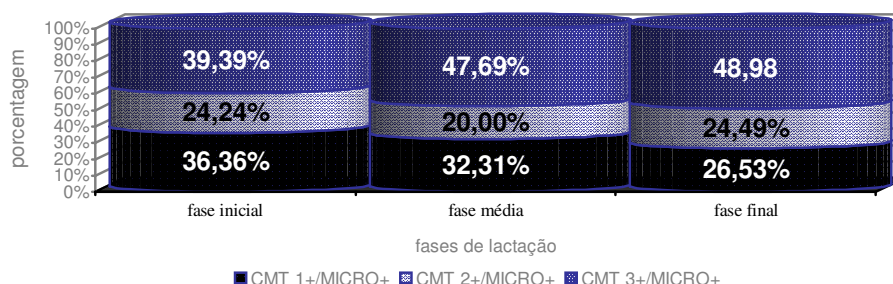


Figura 14. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT, em amostras de leite analisadas nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Quando se considerou apenas a estação do ano em que os exames de CMT e microbiológicos foram realizados, a associação dos resultados positivos e negativos foi analisada em 478 amostras da estação da seca e 229 da época das águas.

Na seca, entre 153 quartos CMT positivos, 100 (65,36%) apresentavam agentes em suas amostras (Quadro 5, Figura 15) e aquelas 47 microbiológico-positivas da estação das águas representaram 71,21% dos 66 quartos reagentes ao CMT (Quadro 6, Figura 15).

Com base nestas informações, a freqüência dos casos de mastite subclínica entre todos os quartos analisados em cada uma das duas estações foi semelhante: 20,92% na seca e 20,52% nas águas.

Quadro 5. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 478 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na estação de seca (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	100	53	153
Negativo	183	142	325
TOTAL	283	195	478

Quadro 6. Resultados positivos e negativos dos exames microbiológicos e de CMT encontrados em 229 amostras de leite coletadas de quartos mamários clinicamente sadios na estação de águas (Jaboticabal, 2007).

Exame microbiológico			
Resultado do CMT	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	47	19	66
Negativo	98	65	163
TOTAL	145	84	229

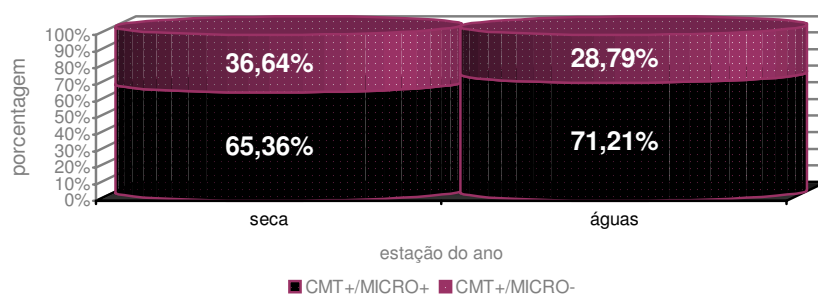


Figura 15. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite positivas (+) ao CMT nas estações do ano de seca e de águas.

Nos 325 resultados CMT negativos da estação da seca, 142 (43,69%) também foram microbiologicamente negativos (Quadro 5 e Figura 16), da mesma forma que 65 (39,88%) das 163 amostras CMT negativas da estação chuvosa (Quadro 6 e Figura 16).

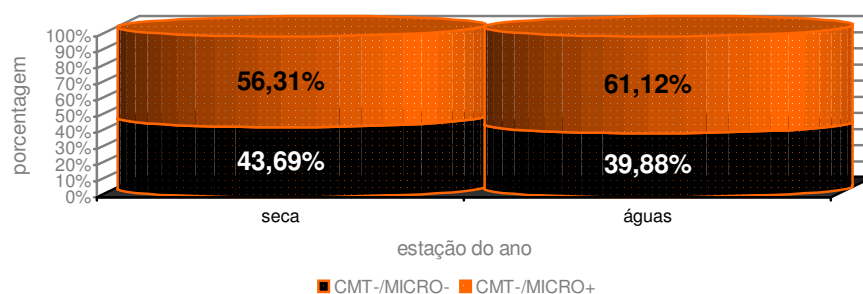


Figura 16. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos (+) e negativos (-) do exame microbiológico (MICRO) entre as amostras de leite negativas (-) ao CMT nas estações do ano de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

A confirmação microbiológica dos resultados positivos de CMT foi elevada nos dois momentos quando a reação ao CMT apresentou a intensidade de 3+, representando 47,00% dos 100 exames microbiológico e CMT positivos da estação da seca e 46,97% dos 66 exames das águas (Tabela 18 e Figura 17).

Tabela 18. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT em amostras analisadas nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Intensidade do resultado CMT+	Fase de lactação	Resultado do exame microbiológico	n	%
1+	Águas	Positivo	21	31,82
	Seca	Positivo	31	31,00
2+	Águas	Positivo	14	21,21
	Seca	Positivo	22	22,00
3+	Águas	Positivo	31	46,97
	Seca	Positivo	47	47,00

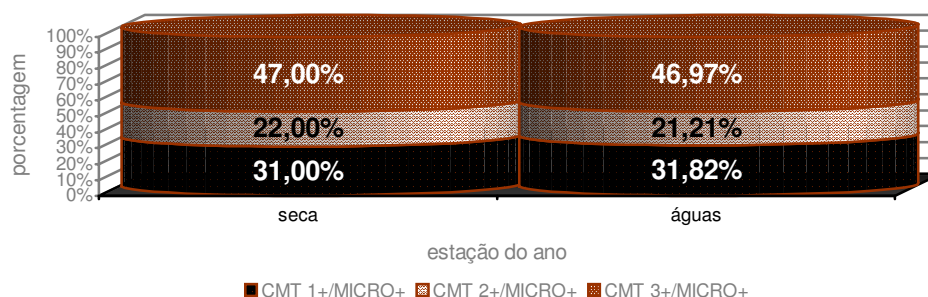


Figura 17. Distribuição, em porcentagem, dos resultados positivos do exame microbiológico entre as diferentes intensidades das reações positivas do CMT, em amostras de leite analisadas nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Para associar os resultados entre o CMT e a CCS, foram empregadas 668 amostras. Independente da presença ou ausência de microrganismos, da estação do ano ou da fase de lactação, a correlação entre a CCST e o CMT foi significativa ($p < 0.0001$) e igual a 0,42. Empregando o teste de qui quadrado foi confirmado grau de dependência das duas variáveis.

Nos 463 quartos mamários que apresentaram reações negativas ao CMT, a média da CCST foi 1,71 enquanto para os 205 quartos mamários que apresentaram reações positivas ao CMT, a média foi consideravelmente maior: 2,23 (Tabela 19).

Tabela 19. Médias, desvios padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras coletadas de quartos mamários positivos e negativos ao CMT entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Resultado do CMT	Variáveis	n	Média $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
Negativo	CCST	463	1,71 $\pm$ 0,29 A	1,58	5,58
Positivo	CCST	205	2,23 $\pm$ 0,41 B	1,58	5,35

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Nas amostras reagentes positivas ao CMT, a média da CCST aumentou conforme a intensidade de reação, de 1,91 na reação 1+, para 2,18 na reação 2+ e 2,51 em 3+ (Tabela 20).

Tabela 20. Médias, desvios padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras positivas ao CMT em diferentes intensidades de reação coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Intensidades do CMT	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
1+	CCST	69	1,91 ± 0,37 A	1,58	4,17
2+	CCST	49	2,18 ± 0,55 AB	1,58	4,85
3+	CCST	87	2,51 ± 0,74 B	1,58	5,35

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Levando em consideração as amostras de leite com resultados negativos ao CMT em cada uma das três diferentes fases de lactação, independentemente da presença de microrganismos ou da influência da estação do ano, a CCST média na fase inicial foi 1,69, na fase média 1,73 e na fase final 1,69 (Tabela 21). Para os quartos mamários com reação positiva ao CMT nas mesmas condições citadas acima, a média de CCST das amostras de leite foi 2,23 no início de lactação, 2,18 na fase média e 2,30 na final (Tabela 21).

Tabela 21. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras coletadas de quartos mamários positivos e negativos ao CMT nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Resultado do CMT	Fase de lactação	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Negativo	Inicial	CCST	117	1,69 ± 0,15 A	1,58	3,03
	Média	CCST	221	1,73 ± 0,36 A	1,58	5,58
	Final	CCST	125	1,69 ± 0,23 A	1,58	4,58
Positivo	Inicial	CCST	30	2,23 ± 0,61 B	1,58	4,34
	Média	CCST	103	2,18 ± 0,63 B	1,58	5,35
	Final	CCST	72	2,30 ± 0,60 A	1,58	4,85

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Na época das águas, entre as amostras negativas ao CMT, observou-se CCST média de 1,69 e na estação da seca ela foi igual a 1,73. Os resultados CMT positivos das amostras obtidas em cada uma das estações determinaram CCST igual a 2,35 nas águas e 2,17 na seca (Tabela 22).

Tabela 22. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras de leite de quartos mamários positivos e negativos ao CMT nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Resultado do CMT	Fase de lactação	Variáveis	n	Média C DP	Mínimo	Máximo
Negativo	Águas	CCST	163	1,69 ± 0,22 A	1,58	4,59
	Seca	CCST	300	1,73 ± 0,32 A	1,58	5,58
Positivo	Águas	CCST	64	2,35 ± 0,65 A	1,58	4,89
	Seca	CCST	141	2,17 ± 0,60 A	1,58	5,35

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Para associação entre os resultados de CCS e de isolamento microbiológico foram utilizadas 643 amostras. Nas 252 amostras negativas, independente da fase de lactação, da estação do ano e dos resultados de CMT, a média da CCST encontrada foi 1,79. Nas 391 amostras positivas, independente do agente etiológico encontrado, de haverem sido isolados em crescimento puro ou em associação, da fase de lactação, da estação do ano e dos resultados de CMT, a média da CCST encontrada foi 1,92 (Tabela 23).

Tabela 23. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras positivas e negativas ao exame microbiológico, coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Resultado do exame microbiológico	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Negativo	CCST	252	1,79 ± 0,38 A	1,58	5,35
Positivo	CCST	391	1,92 ± 0,49 B	1,58	5,58

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Em função do número de observações possíveis no presente estudo, a relação entre a quantidade de células somáticas e os agentes etiológicos foi realizada considerando-se os agentes mais frequentemente isolados, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e *Micrococcus* spp., sempre empregando as amostras onde estes foram encontrados em crescimento puro.

Dessa maneira, nas amostras de onde isolou-se apenas *Corynebacterium* spp. a média da CCST foi 1,95; naquelas onde encontrou-se apenas SCN, a média foi igual a 1,80. Finalmente, nas amostras contendo apenas *Micrococcus* spp., a CCST média foi 1,93 (Tabela 24).

Tabela 24. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras contendo crescimentos puros de *Corynebacterium* spp., SCN e *Micrococcus* spp., coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
<i>Corynebacterium</i> spp.	CCST	169	1,95 ± 0,71 A	1,58	5,21
SCN	CCST	37	1,80 ± 0,21 A	1,58	3,84
<i>Micrococcus</i> spp.	CCST	21	1,93 ± 0,59 A	1,58	4,92

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Associando os resultados de CCS e de isolamento microbiológico na fase inicial da lactação, observou-se que nas amostras negativas para o isolamento, independente da estação do ano e dos resultados de CMT, a média da CCST foi 1,75. Na fase média, o mesmo tipo de amostras revelou média de CCST 1,73 e na fase final da lactação foi 1,97.

Nas amostras positivas, independente do agente etiológico encontrado, de haverem sido isolados em crescimento puro ou em associação, da estação do ano e dos resultados de CMT, a média da CCST foi 1,87 na fase inicial. Na fase seguinte, a média foi de 1,96 e no final, as amostras positivas contaram com média da CCST igual a 1,91 (Tabela 25).

Tabela 25. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras microbiologicamente positivas e negativas coletadas de quartos mamários clinicamente saudáveis nas fases inicial, média e final da lactação (Jaboticabal, 2007).

Resultado do microbiológico	Fase de lactação	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Positivo	Inicial	CCST	80	1,87± 0,39 A	1,58	4,34
	Média	CCST	189	1,96± 0,55 A	1,58	5,58
	Final	CCST	122	1,91± 0,44 A	1,58	4,85
Negativo	Inicial	CCST	57	1,75± 0,27 A	1,58	3,94
	Média	CCST	133	1,73± 0,33 A	1,58	5,35
	Final	CCST	62	1,97± 0,52 A	1,58	4,56

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

Na época da seca as amostras negativas apresentaram média de CCST igual a 1,74 e na época das águas, esse valor foi 1,92. Nas amostras positivas da estação da seca, a CCST média foi 1,95 e nas águas ela foi 1,88 (Tabela 26).

Tabela 26. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras microbiologicamente positivas e negativas coletadas de quartos mamários clinicamente saudáveis nas estações de seca e de águas (Jaboticabal, 2007).

Resultado do microbiológico	Fase de lactação	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Positivo	Águas	CCST	131	1,88 ± 0,45 A	1,58	4,85
	Seca	CCST	260	1,95 ± 0,32 A	1,58	5,58
Negativo	Águas	CCST	74	1,91 ± 0,49 A	1,58	
	Seca	CCST	178	1,74 ± 0,50 A	1,58	5,35

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

A associação dos resultados de CMT, de exame microbiológico e de médias da CCST foi observada em 643 amostras. Independente do estágio de lactação e da estação do ano em que as coletas foram realizadas, nos resultados onde o CMT negativo foi confirmado pela ausência de crescimento microbiológico, ou seja, nas amostras consideradas saudáveis de acordo com os parâmetros empregados neste estudo, a CCST média foi 1,64. Quando o CMT negativo revelou a presença de bactérias, essa média foi: 1,77 (Tabela 27).

No caso dos CMT reagentes positivos com a presença de agentes etiológicos, ou seja, nos casos de mastite subclínica, a média da CCST foi igual a 2,22; na ausência dos tais agentes, esse valor foi 2,25 (Tabela 27).

Tabela 27. Médias, desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos das contagens de células somáticas transformadas (CCST) encontradas em amostras com resultados positivos e negativos ao CMT e ao exame microbiológico, em amostras coletadas de quartos mamários entre Março e Dezembro de 2005 (Jaboticabal, 2007).

Resultado do CMT	Resultado do exame microbiológico	Variáveis	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Negativo	Negativo	SCCT	190	1,64 ± 0,11 B	1,58	3,03
	Positivo	SCCT	255	1,77 ± 0,37 A	1,58	5,58
Positivo	Positivo	SCCT	136	2,22 ± 0,65 A	1,58	5,21
	Negativo	SCCT	62	2,25 ± 0,60 A	1,58	5,35

valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si, grau de significância 95%

VI. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observado apenas 01 quarto (0,14%) com alteração na secreção láctea característica de mastite clínica. Semelhante aos resultados verificados por COSTA et al. (2000) e KAPRONEZAI et al. (2005), que observaram valores da ordem de 0,44% e 0,4%, respectivamente. Por outro lado, TIJARE (1999) e OLIVEIRA (2003) constataram ausência de alterações clínicas do tecido mamário e da secreção láctea das búfalas por eles examinadas. CUNHA et al. (2006), RASHID (2001) e SHUKLA et al. (2005) observaram a ocorrência de alterações no teste da caneca em 2,73%, 2,61% e 7,5% das amostras analisadas, respectivamente.

Este caso ocorreu durante o primeiro mês de lactação contradizendo a afirmação de RANUCCI et al. (1988) segundo a qual o aumento da incidência de mastite clínica é proporcional ao avanço do período de lactação. O fato de ter sido identificado no período das secas contrapõe as afirmações de PREM et al. (1995), SINGH et al. (2002) e SHUKLA et al. (2005) que destacaram a maior prevalência desta enfermidade quando as temperaturas e os índices pluviométricos estão elevados no momento da parição ou da lactação.

Nas 734 amostras de leite bubalino avaliadas pelo CMT no presente estudo, observou-se a predominância dos resultados negativos (69,07%). Os resultados positivos ao CMT em 30,93% das amostras de leite superaram os dados de autores brasileiros como VIANNI et al. (1990), KAPRONEZAI et al. (2005), COSTA et al. (1997b), COSTA et al. (2000), OLIVEIRA (2003) JORGE et al. (2005) e CUNHA et al. (2006) cujas frequências foram de 8,8%, 3,4%, 14,5%, 7,15%, 16,8%, 17,65% e 20,12%, respectivamente. Superaram também as observações de autores indianos como THOMAS et al. (2005), SINGH & SINGH (1994) e MITRA et al. (1995), com 6,71%, 15% e 21,96%, respectivamente; e de RASHID (2001), 24,4%, no Paquistão. Acredita-se que tais diferenças possam ser justificadas pelas distintas condições de manejo observadas entre as várias propriedades estudadas.

Considerando-se a distribuição das reações positivas ao CMT entre as fases de lactação, verificou-se que maior ocorrência em meio às amostras analisadas na fase

final, de modo a acompanhar o aumento fisiológico do número de células somáticas do leite devido à descamação celular; por sofrer menor diluição, uma vez que há redução do volume de leite secretado; ou mesmo porque, com o avanço da lactação, são maiores as chances de infecção da glândula mamária estimulando a defesa celular. Estas observações são semelhantes às de BASTOS (2005), mas diferem dos achados de COSTA et al. (1997a) que relataram maior ocorrência de positividade na fase média da lactação.

Ainda que os resultados CMT negativos tenham prevalecido em qualquer das estações do ano, a ocorrência de reações positivas ao CMT foi maior entre as amostras clinicamente normais avaliadas na estação da seca (32,22%) que entre aquelas estudadas na época das águas (28,46%).

A distribuição dos resultados positivos ao CMT de acordo com a intensidade da reação revelou o predomínio das reações correspondentes a 3+, 44,49%. CUNHA et al. (2006) publicaram frequência menor, 33,98% com 3+. A distribuição dessas reações em relação aos 735 quartos analisados neste trabalho, evidenciou a ocorrência de 13,74% com 3+. Para a mesma intensidade, OLIVEIRA (2003) encontrou a ausência de quartos com reação 3+, KAPRONEZAI et al. (2005), 1,15% e JORGE et al. (2005), 1,84%.

Os resultados dos exames microbiológicos realizados nas 708 amostras analisadas consideraram a presença ou ausência de microrganismos nos quartos mamários e não fizeram referência à presença ou ausência de quadros infecciosos, tendo em vista que não foram realizadas metodologias que permitissem tal designação. Da mesma maneira, os meios de cultura, temperatura e ambientes oferecidos para o isolamento microbiano se fundamentaram nos procedimentos rotineiros de análise de amostras de leite mastítico descritos em literatura, sem que fossem oferecidas condições especiais para o crescimento de um ou outro agente etiológico mais exigente.

Independentemente dos resultados de caneca, CMT, assim como do estágio de lactação ou época do ano, verificou-se que entre as 708 amostras submetidas ao exame microbiológico, 429 (60,59%) apresentaram o isolamento de algum agente bacteriano. A única amostra de leite que apresentou alterações de consistência e

coloração entre as 708 permitiu o isolamento de bactérias (0,14%), demonstrando a ocorrência de mastite clínica no rebanho, de provável origem infecciosa. Nessa secreção estiveram associados *Corynebacterium* spp., *Morganella morganii* e *Enterobacter aerogenes*. CUNHA et al. (2006) isolaram microrganismos de 85,71% das amostras com alterações clínicas, o mesmo acontecendo com RASHID (2001) e COSTA et al. (2000). RASHID (2001) isolou *Streptococcus pyogenes* (35,46%) como o agente mais comum, seguido por *Staphylococcus aureus* (33,99%), *Escherichia coli* (27,09%), *Pseudomonas* spp. (1,97%) e *Corynebacterium pyogenes* (1,48%). COSTA et al. (2000) destacaram *Corynebacterium* spp. (37,5%), *S. uberis* (25,0%) e o *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (25,0%).

O isolamento de agentes ambientais da amostra de mastite clínica não deveria ser considerado uma surpresa em função do hábito aquático que acompanha as fêmeas bubalinas (BRADLEY & GREEN, 2001), mas a reduzida frequência observada confirmou o trabalho realizado por MUHAMMAD et al. (1995). Foram encontrados na estação de seca, ainda que nesta não seja encontrada a maioria dos fatores predisponentes citados por AMARAL et al. (2005) que favorecem a contaminação e o crescimento bacteriano nos tetos. Sua identificação na fase inicial da lactação corrobora as sugestões de BRADLEY & GREEN (2000), que preconizam a adoção de maiores cuidados no período seco por acreditarem que nesta oportunidade os animais podem entrar em contato com os referidos microrganismos e adquirir a infecção, que pode persistir e se tornar evidente no pós-parto, momento em que a imunidade encontra-se fisiologicamente diminuída.

A ocorrência de microrganismos em 428 (60,54%) amostras de leite oriundas de 707 quartos mamários sem alterações clínicas foi superior às observadas por TIJARE et al. (1999), COSTA et al. (1999) e KAPRONEZAI et al. (2005) que verificaram valores da ordem de 26,77%, 37,44% e de 24,4%, respectivamente. Por outro lado, MEIRELLES (1997), OLIVEIRA (1997), MORONI et al. (2006) e CUNHA et al. (2006), constatarem frequências ainda maiores que os observados neste trabalho, quais sejam: 73,41%, 70,9% , 63,0%, 85,71% e 78,64%, respectivamente.

O exame microbiológico foi positivo em 60,34%, 57,93% e 65,31% das amostras analisadas nas fases inicial, média e final da lactação. PREM et al. (1995) e SINGH et al. (2001) assinalaram que a maior ocorrência das infecções foi entre 0 e 40 e entre 0 e 90 dias pós-parto, respectivamente. Por outro lado, JOSHI & GOKHALE (2006), verificaram maior predisposição para infecções em búfalas entre o 4º e o 5º mês após o parto, ou seja, na fase média do período de lactação. A ocorrência revelou um aumento entre as fases média e final da lactação, aproximando-se dos achados de BASTOS (2005) que encontrou uma tendência de aumento nos isolamentos bacterianos com o transcorrer do período de lactação. A maior concentração de amostras com agentes contagiosos nesta fase pode representar os problemas de higiene e desinfecção de tetos e equipamento que garantem o constante desafio às barreiras imunológicas do quarto mamário. A ausência de tratamento dos quartos mamários à secagem leva à persistência dos microrganismos contagiosos na população, o que se torna evidente porque esses resultados estiveram elevados no início da lactação. Também foi maior a ocorrência de microrganismos nas amostras coletadas na estação do ano de chuva, concordando com os achados de PREM et al. (1995), PARANJABE & DAS (1986), SINGH et al. (2001), SHUKLA et al. (2005) e JOSHI & GOKHALE (2006), que observaram significativa redução dos casos na estação da seca em relação à estação das águas.

Foram identificados neste trabalho 579 microrganismos isolados em cultura pura ou em associação, pertencentes a 19 gêneros bacterianos diferentes. Os microrganismos foram isolados principalmente das amostras pertencentes à fase média da lactação (43,35%). Entre os microrganismos isolados, 66,49% cresceram nas amostras de leite coletadas na estação da seca.

Concordando com os achados de MUHAMMAD et al. (1995), entre eles predominaram comensais de membranas de mucosas respiratórias, digestivas, urogenitais, da pele e habitantes do solo, de águas, de alimentos, causadores da mastite de origem contagiosa. Os microrganismos de origem ambiental apareceram, mas em proporções muito baixas, nas amostras de leite, possivelmente porque as búfalas desta propriedade não tinham acesso a coleções de água. Assim, entre as 579

bactérias isoladas, independente de terem crescido na fora pura ou em associação, as mais freqüentes foram *Corynebacterium* spp. (47,67%); SCN (16,75%) e *Micrococcus* spp. (7,08%).

Durante todo o intervalo do estudo notou-se a predominância do *Corynebacterium* spp., em qualquer fase de lactação ou estação do ano em que as amostras tenham sido coletadas. Esse gênero, que representou quase metade de todos os microrganismos encontrados nesse estudo, inclui bactérias classificadas como comensais de membranas mucosas de animais. Apesar da maioria das espécies não ser responsável por enfermidades, são agentes de elevadíssima infectividade, disseminando-se facilmente entre fontes de infecção e suscetíveis e mantendo grande número de portadores dentro do rebanho. Na propriedade em que as amostras foram coletadas a disseminação pode ter sido garantida por alguns fatores como a não realização do tratamento curativo e preventivo dos quartos à secagem e a não utilização do cloro como sanitizante do equipamento após o processo de lavagem pelo fato deste, segundo as orientações da empresa responsável pela manutenção do equipamento de ordenha, estar incluído na fórmula dos detergentes.

Deve-se assinalar, contudo, que este grupo de microrganismos não mereceu destaque e nem mesmo foi referenciado por muitos dos autores na etiologia das mastites bubalinas. No entanto, COSTA et al. (1997b), MITRA et al. (1995), COSTA et al. (2000) e CUNHA et al. (2006), destacaram freqüências de isolamento de *Corynebacterium* spp. como 59,25%, 6,89%, 19,76% e 13,58% dos casos de mastites subclínicas.

O gênero *Staphylococcus* spp. foi o mais prevalente para um grande número de autores (NAIKNAWARE et al., 1998; COSTA et al., 1999; KAPRONEZAI, 2004; CUNHA et al., 2006), enquanto no presente estudo, SCN e SCP somaram 111 isolamentos que representaram 19,17% dos 579 agentes identificados. Uma ocorrência baixa em comparação com 45,30% de MITRA et al. (1995), 38,8% de OLIVEIRA (1997), 38,99% de TIJARE et al. (1999) e 20,97% de COSTA et al. (2000).

Os SCN corresponderam a 16,75% das 579 bactérias isoladas e identificadas. Observações semelhantes foram realizadas por MORONI et al. (2006) e OLIVEIRA

(1997), que também assinalaram maior ocorrência destes microrganismos. Todavia, os achados de COSTA et al. (1997b) e COSTA et al. (2000), revelaram, entre os estafilococos, que os SCN foram os que apresentaram menor frequência de isolamento.

Das 668 amostras de leite oriundas de búfalas clinicamente sadias analisadas ao longo do intervalo de estudo, a CCST média foi de 1,87, independentemente do resultado do CMT, da presença ou ausência de microrganismos nas amostras, da fase de lactação e da estação do ano em que foram coletadas. Este achado foi inferior ao obtido por CERÓN-MUÑOZ et al. (2002), de 1,13.

No presente estudo houve elevação gradual das médias de CCST e na fase final ela foi a maior, 1,92. No entanto, não se observou diferença estatística entre as contagens médias. Essa elevação coincidiu com a maior taxa de CMT positivos no final da lactação, sugerindo a importância do fator diluição sobre a reação ao CMT, como afirmaram AMARAL et al. (2005).

Nas amostras obtidas durante a seca e a estação das águas, as médias de CCST foram as mesmas, confirmando o resultado da análise de variância que demonstrou a ausência de influência das estações do ano sobre a CCST. Tais achados contrariaram os observados por SINGH & LUDRI (2001), que, ao avaliarem amostras na época seca de frio e de calor, constataram médias com diferenças significativamente maiores na estação de calor.

A análise dos dados revela que entre as 219 amostras de leite oriundas de quartos reagentes ao CMT, 147 (67,12%) foram confirmadas bacteriologicamente. Tais achados são maiores que os obtidos por THOMAS et al. (2005), que observaram a confirmação microbiana em 12,0% dos quartos mamários CMT positivos por eles analisados. Conforme esses resultados, entre os 734 quartos mamários clinicamente sadios, a prevalência de mastite subclínica contando com agentes etiológicos foi de 20,03%. Esta confirmação microbiológica foi observada principalmente entre as amostras que apresentaram reação com intensidade de 3+ (46,26%), concordando com EL SAGHEER et al. (1992) no Egito e com CUNHA et al. (2006) no Brasil, que verificaram maior frequência de isolamentos entre as amostras que apresentaram CMT 3+.

Ainda que a fase inicial da lactação tenha contado com a menor frequência de resultados positivos ao CMT, foi nela que se observou a maior confirmação destes resultados com o exame microbiológico positivo (80,49%), enfatizando a importância do tratamento dos quartos mamários, como medida de controle de casos de prevenção e controle de mastite prevenção. Entre as estações do ano, as confirmações entre microbiológico e CMT aconteceram principalmente nas águas, confirmação que indica problemas de higienização e desinfecção de equipamentos e de tetos.

A ocorrência de 72 (32,88%) amostras com resultados positivos ao CMT sem o isolamento de microrganismos, talvez possa ser atribuída à provável interferência de fatores fisiológicos ou de manejo sugeridos, tais como o período de lactação, o momento da ordenha em que os jatos são coletados, as épocas do ano, a idade das vacas e os intervalos entre as ordenhas (SALONIEMI, 1995; THIERS et al., 1999). Acredita-se, também que este achado possa ser decorrente da presença de microrganismos de crescimento mais lento e com maiores exigências que não foram contempladas no processo de isolamento empregado (LANGONI et al., 2001). De acordo com XIA (2006), o elevado conteúdo de gordura e proteína do leite bubalino não causa interferência na formação do gel durante a reação do CMT. A maior porcentagem desse tipo de amostras coletadas na seca sugere fortemente que o menor volume de leite produzido nessa estação influencia a reação por determinar uma menor diluição das células.

As amostras CMT negativas sem isolamento microbiano representaram 42,42%. Por outro lado, parece ser preocupante a elevada ocorrência (57,58%) de resultados negativos ao CMT cujas amostras evidenciaram presença bacteriana, entre as quais isolou-se principalmente o *Corynebacterium* spp. Ainda que o simples isolamento destes microrganismos não permita caracterizar a presença da doença e/ou da infecção, acredita-se que tais quartos possam constituir-se em fontes de infecção, de modo a propiciar a persistência de agentes contagiosos no rebanho.

A correlação entre a CCST e o CMT foi significativa ($p < 0.0001$) e igual a 0,42, independente da presença ou ausência de microrganismos, da estação do ano ou da fase de lactação. Empregando-se o teste de qui quadrado também foi confirmado o

grau de dependência das duas variáveis. Esse valor é inferior à correlação de 0,53 vista por JORGE et al. (2005).

No presente trabalho, a média da CCST nas amostras com reações negativas ao CMT foi 1,71, enquanto a média das amostras positivas para o teste foi de 2,23, uma diferença significativa.

As CCST médias das amostras CMT negativas não apresentaram variação significativa entre as fases de lactação. No entanto, o efeito de diluição do leite secretado pode ter influenciado na reação do CMT, pois a ocorrência de resultados CMT negativos sofreu gradual redução desde o começo até o final da lactação, respectivamente 76,96%, 68,28% e 63,16%.

Nas amostras CMT positivas, as CCST médias acompanharam o aumento da intensidade de reação do CMT: 1,91 na reação 1+, 2,18 na reação 2+ e 2,51 na reação 3+. Houve uma diferença significativa entre os resultados de 1+ e 3+.

Foram significativas as diferenças observadas entre as médias da CCST nas amostras de leite que apresentaram ou não bactérias, respectivamente 1,92 e 1,79, independente da reação apresentada ao CMT. Considerando a presença ou ausência de quadros infecciosos, MORONI et al. (2006) verificaram escores de 2,49 e 2,93, respectivamente.

Em bovinos, ZAFALON et al. (1999) estudaram a influência do *Corynebacterium* spp., SCP e SCN sobre a CCS de quartos mamários comprometidos pela mastite subclínica causada por eles. Comparando os quartos afetados com seus homólogos sadios, ressaltaram que a maior variação foi determinada pelos SCN e os *Corynebacterium* spp. foram os que menos interferiram. Nas observações deste trabalho, sem considerar o fato de serem reagentes ou não ao CMT, não houve diferenças estatisticamente significativas das médias de CCST encontradas entre os agentes mais frequentemente isolados: o *Corynebacterium* spp. esteve relacionado a 1,95, os *Micrococcus* spp. a 1,93 e os SCN a 1,80.

Para KAPRONEZAI (2004), os estafilococos também provocaram a menor influência sendo superados pelos *Corynebacterium* spp. e principalmente pelos *Streptococcus* spp.. MORONI et al. (2006) concordaram com este autor quando

encontraram o maior escore nos quartos infectados por estreptococos (3,62). Quanto aos quartos infectados por SCN no trabalho dos referidos autores, a CCST média foi 2,80 e no presente trabalho, as amostras que apresentaram este agente, a média observada foi 1,80.

No caso de mastite subclínica (CMT reagentes com a presença de microrganismos), a média da CCST foi igual a 2,22. Esse valor mostrou-se de acordo com o escore observado nas amostras positivas ao CMT no presente estudo. Quando as amostras CMT positivas estiveram associadas a exames microbiológicos negativos, a CCST média foi de 2,25, semelhante às amostras com mastite clínica, mas significativamente superior às amostras saudáveis.

Para as amostras sadias, ou seja, aquelas negativas tanto ao CMT quanto ao exame microbiológico, independente do estágio de lactação e da estação do ano em que as coletas foram realizadas, a CCST média foi 1,64.

Nos quartos em que o CMT apresentou resultado negativo, mas foi acusada a presença de microrganismos na secreção, a média de CCST foi 1,77. Valor este superior ao encontrado nas amostras sadias (1,64), mas inferior à média da CCS associada aos resultados de CMT positivos (2,23), justificando a grande quantidade os resultados CMT negativos. Acrescenta-se, dessa maneira, mais dados sobre a falha do CMT em identificar os quartos mamários aparentemente sadios que estejam eliminando microrganismos em sua secreção (DHAKAL, 1995; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA, 2003; THOMAS, 2004; KAPRONEZAI et al., 2005). De acordo com XIA (2006), esse tipo de problema é encontrado devido à reduzida contagem de células somáticas nas amostras de leite que interfere na formação do gel, podendo ser resolvido com uma maior concentração do detergente do CMT, mas modificando a descrição de SCHALM & NOORLANDER (1957) que sugerem a proporção de 1:1.

No Brasil a rotina de ordenha de búfalas leiteiras tem na palpação e na inspeção do úbere, bem como no teste da caneca de fundo escuro do leite os únicos instrumentos para triagem de quartos sadios a serem submetidos ao procedimento de ordenha. No entanto, tais avaliações não refletem o real estado sanitário da glândula, sendo as infecções subclínicas e as colonizações de teto freqüentemente observadas

em exames mais minuciosos como o microbiológico. Embora alguns autores acreditem que o CMT possa ser empregado como método indireto de auxílio no diagnóstico de mastite subclínica em búfalas, pôde-se observar, com os dados coletados e analisados no presente estudo, que existem sérias restrições quanto a essa idéia em função das baixas contagens celulares, tanto na presença quanto na ausência de bactérias nos quartos mamários.

Sua mais importante limitação esteve representada pelos quartos classificados como negativos, que, ao serem submetidos ao exame microbiológico, revelaram-se portadores de agentes etiológicos. Mesmo não tendo sido definidos quadros infecciosos, eles estavam sendo eliminados, podendo caracterizar as fontes de infecção que permanecem sem diagnóstico e que garantem a persistência de uma população microbiana responsável por alterações não apenas celulares, mas também teciduais que, de forma crônica, comprometem a saúde da glândula mamária e a capacidade produtiva do animal.

O exame microbiológico se apresentou como a referência mais segura na identificação de quartos acometidos por mastite subclínica envolvendo microrganismos. O método indireto de contagem automática de células somáticas, transformadas para avaliação estatística, por sua vez, ofereceu mais informações para a definição de um padrão mais sensível e específico, em conjunto com outros estudos.

VII. CONCLUSÕES

Considerando-se as informações obtidas no presente estudo, pode-se concluir que:

- A ocorrência de um único caso de mastite clínica (0,14%) evidenciou a elevada resistência das fêmeas desta espécie no desenvolvimento de alterações funcionais evidentes. O fato de ter ocorrido na fase inicial da lactação e de ter envolvido microrganismos de origem ambiental (*Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*), reforça a necessidade da adoção de cuidados com o animal durante o período seco.
- A ocorrência de poucos casos de mastite subclínica (20,03%) dos quais isolou-se principalmente microrganismos contagiosos, demonstrou a maior resistência das fêmeas bubalinas no estabelecimento da infecção intramamária, quando comparada a das fêmeas bovinas;
- Os resultados negativos ao CMT predominaram durante todo o estudo (69,07%), independentemente da fase de lactação ou estação do ano consideradas. No entanto, os resultados positivos do exame microbiológico em 57,58% das amostras negativas ao CMT observados ao longo do mesmo intervalo demonstraram a falha deste método auxiliar de diagnóstico na identificação de quartos mamários portadores de microrganismos.
- A elevada frequência de isolamentos de microrganismos contagiosos entre as amostras de leite analisadas, independentemente da estação do ano e da fase de lactação, evidenciou a importância da adoção dos procedimentos corretos de higienização e desinfecção de tetos e de equipamentos durante o processo de ordenha e entre as ordenhas, bem como do uso do tratamento à secagem.
- A elevada ocorrência de isolamentos de *Corynebacterium* spp. (47,67%), independentemente da fase de lactação, da estação do ano ou da reação ao CMT, mostrou a importância desse microrganismo de alta infectividade dentro do rebanho. Ainda que a sua patogenicidade seja considerada baixa, trata-se de um agente etiológico em potencial de quadros de mastite particularmente quando se consideram os quartos mamários que não apresentaram reação ao CMT.

- As médias de contagens de células somáticas transformadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de leite positivas (2,23) e negativas (1,71) ao CMT, do mesmo modo que entre as amostras positivas (1,92) e negativas (1,79) ao exame microbiológico.
- Considerando-se as amostras negativas ao CMT, a CCST média das amostras com exame microbiológico positivo (1,77) foi significativamente maior do que a média daquelas com ausência de isolamento (1,64). No entanto, a ausência de reação ao CMT pode ser justificada pelo fato dela ter sido inferior à média da CCST das amostras portadoras de mastite subclínica (2,22).
- De acordo com as observações do presente estudo, a limitação mais importante do CMT como método de diagnóstico de mastite subclínica em búfalas esteve relacionada aos quartos não reagentes ao CMT, mas com isolamento microbiano positivo, uma vez que poderiam representar fontes de infecção não identificadas.

VII. REFERÊNCIAS

- ALI, A. K. A., and G. E. SHOOK. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. **Journal of Dairy Sciences**, v. 63, p. 487–90, 1980.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F. Mastite bubalina. **CBQL em Revista**, v. 1, n. 4, p. 16-20, 2003.
- AMORIM JÚNIOR, A.A.; MIGLINO, M.A.; AMORIM, M.J.A.A.L.; SANTOS, T.C. Sistematização da veia cava cranial em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 306-10, 2002.
- ANDREWS, R.J., KITCHEN, B.J., KWEE, W.S., DUNCALFE, F. Relationship between individual cow somatic cell counts and the mastitis infection status of the udder. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 38, p. 71-4, 1983.
- 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 Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 77-83, abril/jun, 2005. Disponível em: <<http://www.cbqa.org.br>>. acesso em 22 abr. 2007.
- BARBERIO, A.; RAVAROTTO, L.; TURILLI, C. Programa de luta contra mastite bovina realizado no nordeste da Itália (região do Veneto). **Napgama**, ano II, n. 6, p. 7-11, 1999.
- BARUSELLI, M.S. Sistemas de produção de carne e leite a pasto. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p. 143-9.
- BASTIANETTO, E. Aspectos econômicos da criação de bubalinos em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação de Buiatria de Minas Gerais, 2005.

BASTOS, P. A. S. Constituição físico-química, celular e microbiológica do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no Estado de São Paulo. **Boletim do búfalo. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**, n. 2, p. 38, jun. 2005.

BATHIA, K.L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo milk. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994. v. 2. p. 162.

BIERENS, M. Stricter hygiene regulations for milk and milk products from 1994. **Lait et Nous**, n. 3, p. 22-3, 1993.

BOVERA, F.; CUTRIGNELLI, M.I.; MARCHIELLO, M.; LELLA, T. di. Milk electrical conductivity of the Italian Mediterranean buffalo. **Bubalus Bubalis**, v. 9, n. 2, p. 61-70, 2003.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Coliform mastitis - the importance of the dry period. In: BRITISH MATITIS CONFERENCE, 2000, Shepton Mallet. **Proceedings...** Shepton Mallet, 2000, p. 28-36.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1845-9, 2001.

BRIÑEZ, W.; MOLERO, E.; VILLALOBOS, C.; MONTIEL, N.; VALBUENA, E.; CASTRO, G.; URDANETA, S. Parâmetros de calidad y gêneros bacterianos más frecuentes em leche cruda de búfala em el município Mara, Estado Zulia. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. X, n. 4, p. 346-52, 2000.

CADY, R.A.; SHAH, S.K.; SCHERMERHORN, E.C.; McDOWELL, R.E. Factors affecting performance of Nili-Ravi buffaloes in Pakistan. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 578-86, 1983.

CANAES, T.S. **Estudo comparativo entre métodos microscópico e eletrônico na contagem de células somáticas do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758)**. 2004. 132 f. Monografia (Iniciação Científica)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CATI – Observações termo-pluviométricas. **Coordenadoria Assistência Técnica Integral**. Marília, 2005.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2885-9, 2002.

CHHABRA, D.; MOGHE, M.N.; TANWANI, S.K. Prevalence of mycotic mastitis in cows and buffaloes in Madhya Pradesh. **Indian Veterinary Journal**, v. 73, p.1-3, 1996.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L.D.; CORASSIN, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. **Ciência Animal Brasileira** v. 5, n. 3, p. 167-70, 2004.

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

COSTA, E.O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.O.B.; VEZON, P.; GABALDI, S.H.; BENITES, N.R.; BARUSELLI, P.S.; PASKE, A. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997a, Caserta. **Proceedings...** Caserta, 1997a, p. 631-4.

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., 1997b, Caserta. **Proceedings...** Caserta, 1997b, p. 635-8.

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**, ano III, n. 1, p. 12-5, 2000.

CUNHA, A.P.; DA SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; DA SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A. DA F.; DA SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e

subclínica de búfalas. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.17-21, jan./mar., 2006

CUNHA NETO, O.C. Utilização do leite de búfala na elaboração de iogurtes e leites fermentados. **Boletim do búfalo. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**, n. 2, p. 40, jun. 2005.

CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Aspectos da qualidade microbiológica do leite de búfala. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 110, p. 18-23, 2003.

DALMÉ, M.C.F. O búfalo na pequena propriedade. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 09 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>. Acesso em: 22 abr. 2007.

DE, U.K.; REENA, M. Respiratory burst and phagocytic activity of milk leukocytes during clinical mastitis in lactating buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 21, n. 2, p.175-81, 2005.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.D; ARAÚJO, W.P. DE; KITAMURA, S.S.; ROSENFELD, A.M.F.; BIRGEL, E.H. Citologia do leite de bufalas (*Bubalus bubalis*) hígidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1087-92, 2004.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.D; BIRGEL, E.H.; KITAMURA, S.S.; ROSENFELD, A.M.F.; MORI, E.; GOMES, C. de O.M.S.; ARAUJO, W.P. de. Milk macrophages from healthy female buffaloes: evaluation of phagocytosis test, spreading and hydrogen peroxide release assays. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 412-9, 2006.

DERIVADOS de leite de búfalas. **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos**. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/leite.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2007.

DHAKAL, I.P. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes at drying off and post calving stages. **Veterinary Review Kathmandu**, v.9/10, n. 2/1, p. 18-22, 1995.

DHAKAL, I.P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 20, n. 3, p. 261-70, 2004.

DHAKAL, I.P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, n. 2, p. 81-6, 2006.

DHAKAL, I.P.; KAPUR, M.P. Investigations on lactose and some other parameters of milk for the detection of subclinical mastitis in buffaloes using fore milk and strippings milk. **International Journal of Animal Sciences**, v. 8, n. 2, p. 237-9, 1993.

DHAKAL, I.P.; KAPUR, M.P.; ANSHU, S. Significance of differential somatic cell counts in milk for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using foremilk and strippings milk. **Indian Journal of Animal Health**, v. 31, n. 1, p. 39-42, 1992.

DHAKAL, I.P.; KAPUR, M.P.; BHARDWAJ, R.M. Diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using somatic and viable cell counts. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 585-6, 1991.

DODD, F.H. Symposium: Advances in understanding mastitis. Mastitis - progress on control. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1773-80, 1983.

EDMONDSON, P. Somatic cell counts. **Compendium on continuing education for practicing veterinarian - Large Animal Section**, v. 49, p. 735-7, 1996.

EL SAGHEER, A.M.; ALI, L.; HEGAZI, A.G. California Mastitis Test in relation to subclinical mastitis. **Egyptian Journal of Animal Production**, v. 29, n. 2, p. 255-61, 1992.

FRANCIA, A. DI; MASUCCI, F.; SERRACAPRIOLA, M.T.M. DI; GIOFFRE, F.; PROTO, V. Nutritional factors influencing milk urea in buffaloes. **Italian Journal of Animal Science**, v. 2, n. 1, p. 225-7, 2003.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; FENIZIA, D.; MEROLA, A.; ROMANO, M. Chemical and bacteriological studies on buffalo milk in Caserta province, Italy. **Veterinária Italiana**, v. 32, n. 20, p. 35-9, 1996.

GUIDO, M.C.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; COSTA, E.O. Female bubaline mastitis etiology in brazilian state of São Paulo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL

ALLEVAMENTO DEL BÚFALO,1., 1994. Trabalhos apresentados. S.l.: s.n., 1994. 1 **CD-ROM**.

HAMZA, P.A.; CHOUDHURI, P.C. Chemoprophilactic studies on mastitis in buffaloes. **Indian Journal Dairy Science**, v. 47, p. 723-6, 1994.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-12, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados – Sistema IBGE de recuperação automática**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 abr. 2007.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B.; CORREA, R.C.; KASBURGO, D.G.; PICCININ, A.; VICTORIA, C.; DOMINGUES, P.F. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do Leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-45, 2005.

JOSHI, S.; GOKHALE, S. Status of mastitis as an emerging disease in improved and periurban dairy farms in India. In: NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 2006, New York. **Annals...**New York: New York Academy of Sciences, 2006. v. 1081. p. 74-83.

KAARTINEN, L. Physiology of the bovine udder. In: SANDHOLM, M. et al. **The bovine udder and mastitis**. Finnland:Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 14-23.

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)-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, abr./jun., 2005.

KORHONEN, H.; SANDHOLM, M. Antibacterial defense mechanisms of the udder. In: SANDHOLM, M. In: SANDHOLM, M. et al. **The bovine udder and mastitis**. Finland:Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 37-48.

KOTHE, R.V.; SHERIKAR, A.A.; MUKHARJEE, S.R.; BONDE, A.V. Comparison of rapid tests used for diagnosis of subclinical mastitis. **Journal of Bombay Veterinary College**, v. 4, n. 1/2, p. 1-6, 1993.

KUMAR, P.; THAKUR, D.K. Comparative efficacy of indirect tests for the detection of mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 78, p. 801-3, 2001.

KUMAR, R.; BARTHIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, v. 2, 1994. p. 168.

KUMAR, R.; SHARMA, A. Prevalence, etiology and antibiogram of mastitis in cows and buffaloes in Hisar, Haryana. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 72, n.5, p.361-3, 2002.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; MOLERO FILHO J.R.; BALDINI, S. 2001. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Ars Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 213-7, 2001.

LÁU, H.D. Important economic diseases in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994, v. 2. p. 209-20.

LÁU, H.D.; SINGH, N.P.; HESS, S.J. Comparação de testes indiretos no diagnóstico de mastite subclínica em búfalas. **Boletim de Pesquisa – CPATU**, n. 77, p. 5-13, 1986.

LIMA, A.L.F. DUARTE; J.M.C.; BERROCAL, M.H.M.; CERÓN-MUÑOZ, M.F.; TONHATI, H. Alguns aspectos da contagem de células somáticas no leite de búfalas. In: Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 13., 2001, Bauru. **Resumos...** Bauru, 2001, p. 326.

MAHAPATRA, S.; KAR, B.C.; MISRA, P.R. Occurrence of mycotic mastitis in buffaloes of Orissa. **Indian Veterinary Journal**, v. 73, p. 1021-3, 1996.

MAHRAN, G.A.; HAMZAWI, L.F.; HAGGAG, H.F.; ALI, M.M. Chemical composition of buffalo colostrum and buffalo milk in mastitic animals. **Egyptian Journal of Food Science**, v. 20, n. 1, p. 67-83, 1992.

MEIRELLES, F.S. **Mastite subclínica bacteriana e sua relação com a contagem de células somáticas no leite de búfalas do Estado de Pernambuco**. 1997. 45 f. Dissertação (Mestrado)—Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

MENDOZA SANCHEZ, G.; CERÓN MUÑOZ, M.F.; TONHATI, H.; LIMA, A.L.F.; SENO, L. DE O.; OTAVIANO, A.R. Relationships between somatic cell count score and milk yield of buffaloes in the Sao Paulo state, Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 18, n. 1, p. 17, 2006.

MITRA, M.; GOSH, D.; ALI, K. Prevalence of subclinical mastitis in an organized buffalo farm at Haringhata. **Indian Veterinary Journal**, v. 72, p. 1310-1, 1995.

MORONI, P.; SGOIFO ROSSI, C.; PISONI, G.; BRONZO, V.; CASTIGLIONI, B.; BOETTCHER, P.J. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 998-1003, 2006.

MUHAMMAD, G.; ATHAR, M.; REHMAN, F.; SHAKOOR, A.; KHAN, M.Z. Clinical and therapeutic aspects of *Escherichia coli* mastitis in water buffaloes. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 10, p.581-6, 1995.

NAIKNAWARE, H.S.; SHELKE, D.D.; BHALERAO, D.P. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes in and around Mumbai. **Indian Veterinary Journal**, v. 75, p. 291-2, 1998.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis**. Arlington:W. D. Hoard, Sons Co., 1987. 208 p.

NAZEM, A.M.; AZAB, M.H. Detection of apparently normal milk by screening and confirmatory methods. In: Scientific Congress, Faculty of Veterinary Medicine, 8., 1998, Assiut. **Proceedings...** Assiut, 1998. p. 1-12.

OGNEAN, L.; GROZA, I.; STATOV, C.; CENARIU, M.; DOJANA, N. Particularities regarding the cytological testing of buffalo milk. **Buletinul Universitatii de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj Napoca, Seria Medicina Veterinara**, v. 60, p. 112-7, 2003.

OLIVEIRA, M.V.V. **Exame microbiológico do leite de búfalas e avaliação dos testes de Whiteside e Califórnia Mastitis Test no diagnóstico da mastite bacteriana subclínica em bubalinos**. 1997. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

OLIVEIRA, A.A.F. **Avaliação da citologia aspirativa e de expressão no diagnóstico da mastite bubalina e pesquisa de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* toxigênicas e produtoras de beta-lactamase**. 2003. 87 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

PARANJABE, V.L.; DAS, A.M. Mastitis among buffalo population of Bombay – a bacteriological report. **Indian Veterinary Journal**, v. 63, jun., p. 438-41, 1986.

PASQUINI, M.; TOMMEI, B.; MATTII, S. Buffalo milk: proteins electrophoretic profile and somatic cell count. **Italian Journal of Animal Science**, v. 2, n. 1, p. 299-301, 2003.

PETROVA, N.; TZANKOVA, M. SCC of milk from three breeds of buffaloes in Shoumen region. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 6, p. 895-900, 1999.

PHILPOT, N.W. Somatic cell counts and your mastitis control program. **Dairy Research Report**, p. 48-57, 1986.

PICCININI, R.; MIARELLI, M.; FERRI, B.; TRIPALDI, C.; BELOTTI, M.; DAPRÀ, V.; ORLANDINI, S.; ZECCONI, A. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 2, p. 129-33, 2006.

PREM, C.; BEHRA, G.D.; CHAKRAVARTY, A.K. Comparative incidence of mastitis in relation to certain factors in cattle and buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 65, n. 1, p. 12-4, 1995.

PREM, C.; BEHRA, G-D. Factors influencing occurrence of mastitis genetic and environmental factors. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 48, n 4, p. 271-3, 1995.

PRIYADARSHINI, S.; KANSAL, V.K. Lysozyme activity in buffalo milk: Effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 6, p. 895-9, 2002.

QUINN P. J., CARTER M. E., MARKEY B. K. & CARTER G. R. Mastitis, p. 327-344. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, London. 1994.

RADOTISTIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Mastite. In: _____. **Clínica Veterinária**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 542-629.

RAMOS E SILVA, E.O.T. **Fabricação artesanal de mozzarella elaborada com leite cru de búfala. Estudo da conatminação microbiológica associada à manipulação, em produção manual ou parcialmente mecanizada**. 64 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

RANUCCI, S.; FRUGANTI, G.; VALENTE, C.; TESEI, B.; TULLIO, S. Laboratory tests for subclinical mastitis in buffaloes. **Selezione Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 495-506, 1988.

RASHID, A. Studies on mastitis among dairy buffaloes. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 21, n. 4, p. 220-1, 2001.

RAWDAT, A.M.; OMAIMA, M.M. Some biochemical changes in serum and milk of mastitic buffaloes. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v. 78, n. 4, p. 1737-47, 2000.

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

SALIMEI, E.; MAGLIERI, C.; SIMONI, A.; CAPPUCCIO, A. Feeding installation for total mixed ration: effects on buffalo milk yield and composition. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, n. 2, p. 322, 2005

- SALONIEMI, H. Use of somatic cell count in udder health work. In: SANDHOLM, M. et al. **The bovine udder and mastitis**. Finland:Gummerus Kirjapaino, 1995. p.105-110.
- SANDHOLM, M. Detection of inflammatory changes in milk. In: SANDHOLM, M. et al. **The bovine udder and mastitis**. Finland:Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 89-104.
- SAS/STAT. **User's Guide 8.0.Cary**: SAS Institute (Compact disc). 1999.
- SCHALM, O.M.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia:Lea & Febiger, 1971. 360 p.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the *California Mastitis Test*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.
- SHAILJA, A.; MAHENDRA, S. Post milking teat dip effect on somatic cell count, milk production and composition in cows and buffaloes. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 10, p.1517-22, 2002.
- SHUKLA, S.K.; DIXIT, V.P.; THAPLIYAL, D.C.; GARG, S.K.; KUMAR, A. A note on the incidence of bovine mastitis in relation to teat shape, size and quarters affected. **Indian Veterinary Journal**, v. 74, p. 989-90, 1997.
- SHUKLA, S.K.; DIXIT,V.P.; RAJESH, C. An epidemiological study of mastitis in an organized dairy farm. **Indian Journal of Veterinary Medicine**. v. 25, n. 2, p. 118-20, 2005.
- SILVA, I.D. Functional efficiency of buffalo neutrophils. In: ROLE OF THE BUFFALO IN RURAL DEVELOPMENT IN ASIA, REGIONAL SYMPOSIUM, 7., 1996, Peradeniya, Sri Lanka. **Proceedings...** Peradeniya: NARESA Press, 1996. p. 457-7.
- SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-7, 1994.
- SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T.; AMBAGALA, A.P.N; COORAY, R. Markers of inflammation in buffalo milk In: ROLE OF THE BUFFALO IN RURAL DEVELOPMENT IN ASIA,

REGIONAL SYMPOSIUM, 7., 1996, Peradeniya, Sri Lanka. **Proceedings...**
Peradeniya: NARESA Press, 1996. p. 403-14.

SILVA, M.S.T.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; GONÇALVES, I.A.; MIRANDA, H.A.;
ERCHSEN, R.; FONSECA, R.F.S.R.F.; MELO, J.A.; COSTA, J.M. **Programa de
incentivo à criação de búfalos por pequenos produtores do PRONAF**. Pará, 2003.
35 p.

SINGH, R. S.; BANSAL, B. K. Variation in selected components of milk among different
milk fractions and its relevance to diagnosis of mastitis in buffaloes. **Buffalo Journal**, v.
20, n. 3, p. 213-24, 2004.

SINGH, R.S.; BANSAL, B.K.; RANDHAWA, S.S.; MAVI, P.S. Effect of lactation therapy
on quarter infection and milk composition n specific mastitis of buffaloes. **Indian Journal
of Veterinary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 16-8, 2004.

SINGH, M.; RAJU, S.; PUNDIR, J.K.; RAMESH, C.; TOMAR, K.P.S.; LUDRI, R.S. Effect
of parity, stage of lactation and season on the incidence of mastitis in cattle and
buffaloes. **International Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 2, p. 227-33, 2001.

SINGH, A.; SAINI, A.L.; RANDHAWA, S.S. Variation in somatic cell count in relation to
udder health and milk quality in cross bred cows and buffaloes. **Journal of Livestock
and Poultry Production**, v. 18, n. 3/4, p. 52-62, 2002.

SINGH, M.; LUNDRI, R.S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*)
during different stages of lactation, parity and season. **Asian Australian Journal of
Animal Science**, v. 14, p. 189-92, 2001.

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

SUPINO, M.T.; GALLO, M.; CAPO, G.; MORENA, C.; DURANTE, G.; GALIERO, G.
Buffalo milk produced in the province of Salerno: evaluation of sanitary and product
parameters. **Bubalus Bubalis**, v. 10, n. 1, p. 22-6, 2004.

TANHUANPÄÄ, E. The structure of the udder. In: SANDHOLM, M. et al. **The bovine udder and mastitis**. Finnland:Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 7-13.

TANTILLO, G.; VERGARA, A.; MANGINELLI, T. Evaluation of buffalo milk: health and hygiene aspects. **Latte**, v.22, n.7, p. 70-5, 1997.

TANVEER, A.; BILAL, M.Q.; SHAFIQ, U.; MUHAMMAD, G. Effect of severity of mastitis on pH and specific gravity of buffalo milk. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**. v. 42, n. 3/4, p. 64-67, 2005.

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 96-100, abr./jun., 2005. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br>>. Acesso em: 24 abr. 2007.

THIERS, F de O.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; COSTA E.O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de *Califórnia Mastitis Test* (CMT) no leite de vacas. **Napgama**, ano II, n. 4, p. 9-12, 1999.

THIRUNVUKKARASU, M.; PRABAHARAN, R. Epidemiologic measures of associations between the incidence of mastitis and some of its predisposing factors. **Indian Veterinary Journal**, v. 75, p. 718-22, 1998.

THOMAS, C.S. **Milking management of dairy buffaloes**. 2004. 52 f. Thesis (Doctor)-Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2004.

THOMAS, C.S.; NIMMERVOLL, H.; BOIJE, C.; SVENNERSTEN SJAUNJA, K.; LUNDEHEIM, N.; OSTENSSON, K. Subclinical mastitis in buffaloes in different herd sizes and milking management systems. In: IDF - INTERNATIONAL MASTITIS CONFERENCE, 4., 2005, Maastricht, Netherlands. **Proceedings...** Maastricht: Wageningen Academic Publishers, 2005. p 728-34.

TIJARE, D.B.; SINGH, V.K.; CHATUTURVEDI, V.K.; DHANESAR, N.S. Sensitivity of indirect tests in detection of subclinical mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 76, p. 912-5, 1999.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6.ed. São Paulo:Roca, 2002. 532 p.

TONHATI, H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1, 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p. 90-109.

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 Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 5, p. 738-42, 2003.

TUTEJA, F.C.; KAPUR, M.P.; ANSHU, S. Efficacy of dry-period teat canal antibiotic therapy for mastitis control in buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 18, n. 3, p. 361-5, 2002.

TUTEJA, F.C.; KAPUR, M.P.; SHARMA, A.; MANUJA, B. Mastitis pathogens from apparently healthy buffaloes and their relationship to somatic cell count of milk. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 162-3, 2001.

TZANKOVA, M.; PETROVA, N. Production and composition of milk from three breeds of buffaloes in Shoumen Region. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 1, p. 103-6, 2000.

ULLAH, S.; AHMAD, T.; BILAL, M.Q.; RAHMAN, Z.; MUHAMMAD, G.; RAHMAN, S.U. The effect of severity of mastitis on protein and fat contents of buffalo milk. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 25, n. 1, p. 1-4, 2005.

UPPAL, S.K.; SINGH, K.B.; ROY, K.S.; NAURIYAL, D.C.; BANSAL, B.K. Natural defense mechanism against mastitis: A comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 125-31, 1994.

VALE, W.G. Perspectivas da bubalinocultura no Brasil e na América Latina. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1, 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p. 1-26.

VIANNI, M.C.E.; LÁZARO, N.S.; SANTANA, D.M.N.; AFONSO, J.A.B.; MENDONÇA, C.L. Qualidade microbiológica do leite "in natura" de rebanhos bubalinos do Estado do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 69-72, mar. 2000.

VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A.; ROSSETI, D.J.G.; LONGHI, J.L.; SICHER, M. Eficiência do *California Mastitis Test* (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 3-4, 1990.

VIVEK, S.; ANSHU, S.; RAVINDER, S.; ASHOK, K. Comparison of various indirect tests for the detection of subclinical mastitis. **Buffalo Journal**, v. 18, n. 2, p. 267-71, 2002.

XIA, S.S. **The rheology of gel formed during the California Mastitis Test**. 2006. 126 f. Thesis (Master Science)-Department of Engineering, University of Waikato, Hamilton, New Zealand, 2006.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D.; OLIVEIRA, J.A. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite clínica. **Napgama**, ano II, n. 6, p. 4-6, 1999.

ANEXO

Tabela 1. Distribuição das 29 cepas de *Rhodococcus equi* isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Rhodococcus equi</i>	14	48,28
<i>Rhodococcus equi</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	10	34,48
<i>Rhodococcus equi</i> + SCN	2	6,90
<i>Rhodococcus equi</i> + <i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3,45
<i>Rhodococcus equi</i> + SCP	1	3,45
<i>Rhodococcus equi</i> + <i>A. pyogenes</i> + SCN	1	3,45
TOTAL	29	

Tabela 2. Distribuição das 27 cepas de *Streptococcus* spp. em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Streptococcus</i> spp.	3	11,11
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	13	48,15
<i>Streptococcus</i> spp. + SCN	3	11,11
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Micrococcus</i> spp.	2	7,41
<i>Streptococcus</i> spp. + SCP	1	14,81
<i>Streptococcus</i> spp. + SCP + SCN	1	14,81
<i>Streptococcus</i> spp. + SCN + <i>Bacillus</i> spp.	1	14,81
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>L. monocytogenes</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	14,81
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>A. pyogenes</i>	1	14,81
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Micrococcus</i> spp. + SCN	1	14,81
TOTAL	27	

Tabela 3. Distribuição das 27 cepas de *Listeria* spp. em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Listeria</i> sp	9	33,33
<i>Listeria</i> sp + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	18,52
<i>Listeria</i> sp + <i>Micrococcus</i> sp	4	14,81
<i>Listeria</i> sp + <i>Lactobacillus</i> sp	2	7,40
<i>Listeria</i> sp + <i>Bacillus</i> spp.	2	7,40
<i>Listeria</i> sp + <i>Corynebacterium</i> spp. + SCN	2	7,40
<i>Listeria</i> sp + <i>Micrococcus</i> spp. + SCN	1	3,70
<i>Listeria</i> sp + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	1	3,70
<i>Listeria</i> sp + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Actinobacillus</i> spp.	1	3,70
TOTAL	27	

Tabela 4. Distribuição das 22 cepas de *Bacillus* spp. isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Bacillus</i> spp.	8	36,36
<i>Bacillus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	8	36,36
<i>Bacillus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	2	9,09
<i>Bacillus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Micrococcus</i> spp.	1	4,55
<i>Bacillus</i> spp. + SCN + <i>Micrococcus</i> spp.	1	4,55
<i>Bacillus</i> spp. + SCN + <i>Streptococcus</i> spp.	1	4,55
<i>Bacillus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp. + SCN	1	4,55
TOTAL	22	

Tabela 5. Distribuição das 15 cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Lactobacillus</i> spp.	7	46,67
<i>Lactobacillus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	33,33
<i>Lactobacillus</i> spp. + <i>Listeria</i> spp.	2	13,33
<i>Lactobacillus</i> spp. + SCN	1	6,67
TOTAL	15	

Tabela 6. Distribuição das 15 cepas de *Streptococcus* sp isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>Streptococcus</i> sp	3	20,0
<i>Streptococcus</i> sp + <i>C. bovis</i>	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>Corynebacterium</i> sp	4	40,0
<i>Streptococcus</i> sp + <i>Micrococcus</i> sp	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + SCN	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>S. intermedius</i>	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>C. bovis</i> + <i>Corynebacterium</i> sp	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i>	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>Corynebacterium</i> sp + <i>Actinomyces</i> sp	1	6,67
<i>Streptococcus</i> sp + <i>S. faecalis</i> + <i>Micrococcus</i> sp	1	6,67
TOTAL	15	

Tabela 7. Distribuição das 14 cepas de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos (SCP) isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
SCP	3	21,43
SCP + <i>Corynebacterium</i> spp.	3	21,43
SCP + SCN	2	14,29
SCP + <i>R. equi</i>	1	7,14
SCP + <i>Streptococcus</i> spp.	1	7,14
SCP + SCN + <i>Corynebacterium</i> spp.	3	21,43
SCP + <i>Streptococcus</i> spp. + SCN	1	7,14
TOTAL	14	

Tabela 8. Distribuição das 12 cepas de *Arcanobacterium pyogenes* isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	n	%
<i>A. pyogenes</i>	2	16,67
<i>A. pyogenes</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	5	41,67
<i>A. pyogenes</i> + SCN	2	16,67
<i>A. pyogenes</i> + <i>Corynebacterium</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	1	8,33
<i>A. pyogenes</i> + SCN + <i>R. equi</i>	1	8,33
<i>A. pyogenes</i> + SCN + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	8,33
TOTAL	12	

Tabela 9. Distribuição das 05 cepas de *Enterobacter aerogenes* isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	N	%
<i>E. aerogenes</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	3	60,00
<i>E. aerogenes</i> + <i>R. equi</i>	1	20,00
<i>E. aerogenes</i> + <i>Corynebacterium</i> sp + <i>Alcaligenes</i> sp	1	20,00
TOTAL	5	

Tabela 10. Distribuição das 02 cepas de *Actinobacillus* spp. isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	N	%
<i>Actinobacillus</i> spp.+ <i>Listeria</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	50,00
<i>Actinobacillus</i> spp.+ <i>Pasteurella</i> spp.	1	50,00
TOTAL	2	

Tabela 11. Distribuição das 02 cepas de *Pasteurella* spp. isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas clinicamente sadios (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	N	%
<i>Pasteurella</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	50,00
<i>Pasteurella</i> spp. + <i>Actinobacillus</i> spp.	1	50,00
TOTAL	2	

Tabela 12. Distribuição das outras cepas isoladas em culturas puras e em associações a partir de amostras de leite de quartos mamários de búfalas com ou sem alterações clínicas ou subclínicas (Jaboticabal, 2007).

Microrganismos	N	%
<i>Morganella morganii</i>	4	100,0
<i>E. coli</i> + SCN	2	100,0
<i>Citrobacter diversus</i> + <i>Corynebacterium</i> sp	1	100,0
<i>Nocardia</i> spp. + SCN	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	100,0
<i>Alcaligenes</i> sp + <i>Corynebacterium</i> sp + <i>E. aerogenes</i>	1	100,0