

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E DOS MÉTODOS
DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA
EM BÚFALAS**

Danielle Cavalcanti Sales

Zootecnista

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E DOS MÉTODOS
DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA
EM BÚFALAS**

Discente: Danielle Cavalcanti Sales

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Coorientadores: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

Dr. Daniel Jordan de Abreu dos Santos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora em
Zootecnia**

2019

S163e	Sales, Danielle Cavalcanti Estudo da infecção intramamária e dos métodos de triagem para detecção de mastite subclínica em búfalas / Danielle Cavalcanti Sales. -- Jaboticabal, 2019 89 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Humberto Tonhati Coorientador: Adriano Henrique do Nascimento Rangel 1. Saúde animal. 2. Glândulas mamárias. 3. Mastite. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E DOS MÉTODOS DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA EM BÚFALAS

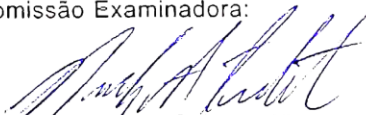
AUTORA: DANIELLE CAVALCANTI SALES

ORIENTADOR: HUMBERTO TONHATI

COORDENADOR: ADRIANO HENRIQUE DO NASCIMENTO RANGEL

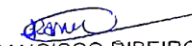
COORDENADOR: DANIEL JORDAN DE ABREU SANTOS

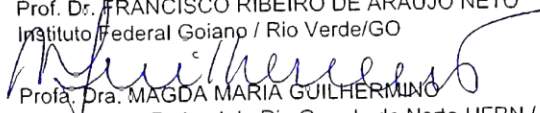
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-Doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP


Prof. Dr. FRANCISCO RIBEIRO DE ARAUJO NETO
Instituto Federal Goiano / Rio Verde/GO


Profa. Dra. MAGDA MARIA GUILHERMINO
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN / Macaíba/RN

Jaboticabal, 03 de outubro de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DANIELLE CAVALCANTI SALES - Nascida em 28 de setembro de 1990 na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. Filha de Irandi José Sales e Elizabete Alves Cavalcanti de Albuquerque Sales. Prestou o seu primeiro vestibular em 2007, com 17 anos, ingressando no curso superior de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde atuou em monitoria e projetos de pesquisa e extensão e integrou o Grupo de Estudos em Sistemas de Produção Animal Sustentável do Rio Grande do Norte. Tratou sobre a bovinocultura de leite nesta região em seu Trabalho de Conclusão de Curso sob coordenação e orientação da Profa. Dra. Magda Maria Guilhermino. Concluiu o curso em setembro de 2013 e, em consequência de seu esforço durante a formação, recebeu menção honrosa como melhor concluinte da turma. Entre setembro e dezembro de 2013, na qualidade de zootecnista, atuou como colaboradora eventual em programa de extensão universitária do Ministério da Educação voltado à sustentabilidade de sistemas de produção de leite na região semiárida. Em março de 2014 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Produção Animal da mesma universidade, com bolsa de estudos da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel. Desenvolveu estudos sobre a produção e qualidade do leite e derivados, restritos às espécies bovina e bubalina, e atuou no LABOLEITE - Laboratório de Qualidade do Leite da UFRN, auxiliando a implementação de suas ações de pesquisa, junto a professores, técnicos e alunos de iniciação científica e de pós-graduação. Obteve o título de mestre em 18 de março de 2016 e, no mesmo ano, ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e coorientação do Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel e do Dr. Daniel Jordan de Abreu dos Santos, com bolsa de estudos do CNPq. Cumprido com seus créditos nesta universidade e desenvolveu seu projeto de pesquisa no Rio Grande do Norte, dessa vez inspirada em compreender a saúde de glândula mamária de búfalas.

“Não basta a leitura sem a unção, não basta a especulação sem a devoção, não basta a pesquisa sem maravilhar-se; não basta a circumspecção (observação) sem o júbilo (alegria), o trabalho sem a piedade, a ciência sem a caridade, a inteligência sem a humildade, o estudo sem a graça”. (São Boaventura, Bispo e Doutor da Igreja)

Dedico
à Deus,
à minha família,
aos animais, aos produtores rurais
e aos consumidores de leite e derivados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Bom Deus, por exatamente tudo.

Ao Governo Federal do Brasil pela oportunidade de estudos em universidades públicas e de qualidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

Aos gestores, docentes, funcionários e colegas da pós-graduação na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pela oportunidade de aprimoramento intelectual e profissional.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Humberto Tonhati, quem me acolheu nesta academia, e ao Prof. Dr. Adriano Rangel pela oportunidade de parceria e amizade.

À Tapuio Agropecuária LTDA - Taipu/RN, na pessoa do Sr. Francisco de Assis Veloso Júnior e seus colaboradores, por abrirem as portas para os nossos trabalhos e oportunizarem nobres momentos de estudos e partilhas de experiências.

À toda a equipe da Escola Agrícola de Jundiá e do Laboratório de Qualidade do Leite (LABOLEITE) da UFRN que ajudaram na logística de coletas e análises, especialmente a Emanuelle, Ingrid, Rhaabe, Michelle, Heloisa e os demais alunos de iniciação científica.

Aos membros examinadores que aceitaram participar e colaborar com essa tese, fazendo parte da comissão de avaliação de projeto e das bancas de qualificação e defesa.

Às companheiras da República Xega U Reio e a amiga potiguar Thaise, que me disponibilizaram uma moradia confortável e alegre, enquanto estive em Jaboticabal/SP.

Aos meus parentes, amigas e amigos pelos momentos compartilhados, em especial ao amigo Josiel Ferreira (UFERSA, RN) e demais profissionais que deixaram em mim pedaços de suas experiências e ensinamentos.

Aos colegas de profissão Dra. Thaise P. de Mello, Prof. Dr. Francisco R. de Araújo Neto e Dr. Daniel Jordan pela ajuda em detalhes importantes dessa tese.

À Profa. Magda Guilhermino, que faz parte da minha formação pessoal e acadêmica, pelo acolhimento em Ribeirão Preto/SP durante a fase de conclusão deste trabalho.

Ao meu companheiro Elton Rodrigues e nossa família, por todo o amor, apoio e paciência.

Aos meus pais, Elizabete A. Cavalcanti e Irandi Sales, e meu único irmão Diego, quem tanto amo, por sempre zelarem pela minha vida e me darem ânimo e estímulo necessários aos meus estudos e minha formação profissional.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Bubalinocultura leiteira.....	2
2.2 Infecção intramamária em búfalas	3
2.3 Prejuízos causados pela mastite	9
2.4 Programa de controle de mastite	10
2.5 Métodos de avaliação da saúde da glândula mamária	12
3. REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 – Mastite subclínica em búfalas e sua relação com a contagem de células somáticas, métodos de triagem e exame microbiológico.....	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Local de estudo e animais	30
2.2 Colheita das amostras de leite	31
2.3 Análises do leite.....	31
2.4 Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1 Caracterização dos quartos mamários de búfalas de acordo com os resultados dos testes de triagem, posição dos tetos e exame microbiológico	34
3.2 Associação entre a contagem de células somáticas, os resultados dos testes de triagem e a presença da infecção intramamária em búfalas	41

4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	46

CAPÍTULO 3 – Avaliação do *California Mastitis Test*, teste Somaticell e Condutividade Elétrica do leite como métodos de triagem de mastite subclínica em búfalas.....

1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Local do estudo e animais	53
2.2 Colheita de amostras de leite.....	53
2.3 Análises do leite.....	53
2.4 Análise dos dados	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4. CONCLUSÃO	62
5. REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 4 – Considerações finais	65



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

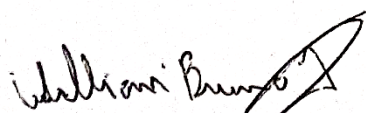
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efetividade dos métodos auxiliares para detecção de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*)", protocolo nº 008551/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Humberto Tonhati, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de Julho de 2017.

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 01/05/2020
Espécie / Linhagem	<i>Bubalus bubalis</i> / Bubalinos / Raça Murrah
Nº de animais	300
Peso / Idade	500 Kg / a partir de 3 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Índia

Jaboticabal, 06 de julho de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

 20/07/2017

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ESTUDO DA INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA E DOS MÉTODOS DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA EM BÚFALAS

RESUMO - A mastite é a enfermidade que mais causa prejuízos de ordem quantitativa e qualitativa nos sistemas de produção de leite no mundo. A prevenção e controle da doença precisam envolver atividades práticas e eficientes que auxiliem a tomada de decisões rápidas na fazenda. Os métodos de triagem para o diagnóstico da mastite aplicados às búfalas leiteiras são aqueles desenvolvidos especificamente para as vacas. Assim, o objetivo geral da tese foi estudar a mastite subclínica em búfalas e avaliar os métodos de triagem que auxiliam o diagnóstico da doença na fazenda. O trabalho se divide em quatro capítulos que tratam de: revisar a literatura sobre as temáticas (I); caracterizar o leite de quartos mamários com e sem infecção intramamária, e avaliar a associação entre a presença de infecção intramamária e as características microbiológicas do leite de quartos mamários de búfalas, posição dos tetos e os resultados dos métodos de triagem (II); e avaliar os testes rápidos *California Mastitis Test*, Somaticell e condutividade elétrica como métodos de triagem para auxiliar o diagnóstico da mastite subclínica em búfalas diretamente na fazenda (III). O estudo foi realizado em um rebanho de búfalas no estado do Rio Grande do Norte. Foram colhidas 533 amostras de leite de quartos mamários que foram submetidas à contagem eletrônica de células somáticas (CCS), aos testes de triagem (*California Mastitis Test* – CMT, teste Somaticell - SO e condutividade elétrica – CEL) e ao exame microbiológico para diagnóstico da mastite subclínica (IMM: positiva/negativa), classificação da infecção (negativa, contagiosa, ambiental, mista e oportunista) e do microrganismo envolvido (negativa, individual ou misto). Foram desenvolvidas análises descritivas por distribuição de frequências, e medidas de posição, dispersão e distribuição dos dados para caracterização dos quartos mamários. Também foram realizadas análises associativas pelo modelo linear generalizado e teste de qui-quadrado para verificar a dependência e correspondência entre os métodos de triagem e a presença da infecção intramamária. A avaliação dos métodos de triagem foi obtida pelas estimativas de estimativas da sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância (coeficiente kappa) e pela curva ROC. A contagem eletrônica de células somáticas foi tomada como referência para a diferenciação dos quartos mamários com alta e baixa CCS, considerando quatro pontos de corte (150, 200, 280 e 400 mil céls/mL) e diferentes critérios de classificação dos quartos mamários pelos métodos de triagem - “traços, 1+, 2+ e 3+” e “1+, 2+ e 3+” (CMT); $SO \geq 150$, 200 e 400 céls/mL; e $CEL \geq 3,0$, 4,0, 5,0 e 6,0 mS/cm. A maioria dos quartos mamários avaliados tinham até 400 mil céls/mL. As reações positivas ao CMT ocorreram em 59,29% dos quartos mamários avaliados, sendo a reação 1+ a mais frequente dentre as positivas. 46,72% dos quartos mamários apresentou CCS acima de 400 mil céls/mL pelo teste SO. A CEL de 49,34% dos quartos mamários era maior que 4,5 mS/cm. As médias de CCS, SO e CEL foram 1.104,90 e 675,95 céls/mL e 4,88 mS/cm, respectivamente. A infecção intramamária foi diagnosticada em 68,73% dos quartos mamários investigados, sendo que metade (50,55%) estava infectada por apenas uma espécie de microrganismo. A maioria dos casos de IMM positiva era do tipo contagiosa (47,62%), principalmente por *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae*, seguida da ambiental (30,69%), principalmente *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterococcus* spp; e oportunista (19,58%),

representada pelos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. Houve variação significativa de CCS nas classes de CMT, SO e CEL. Foi encontrada correspondência altamente significativa entre os testes CMT e Somaticell. Não existe associação entre a CCS, posição do quarto mamário, presença da infecção, tipo da infecção e do microrganismo. Há associação entre a variação da condutividade elétrica e a presença de IMM e concordância entre esta e os resultados de CMT. O critério do CMT que considera a reação de traço foi melhor para selecionar os quartos mamários com CCS a partir de 150 e 200 mil céls/mL. Já para uma triagem menos rigorosa, com CCS nos pontos de corte 280 e 400 mil céls/mL, a melhor avaliação do CMT foi no critério que não considera a reação de traço. As melhores avaliações para o teste Somaticell nos pontos de corte em 150 e 200 mil céls/mL foram nos critérios ≥ 200 , e em 280 e 400 mil céls/mL, foi no critério ≥ 400 . De forma mais específica, os valores críticos do teste Somaticell e condutividade elétrica que maximizam a capacidade de detectar corretamente os quartos mamários de búfalas com contagem de células somáticas de 150, 200, 280 e 400 céls/mL são, respectivamente 253 (244 - 263), 363 (340 - 379), 398 (379 - 418) e 477 (470 - 485) mil céls/mL e 4,5 mS/cm. Os métodos de triagem realizados na fazenda auxiliam a identificação de quartos mamários com alta contagem de células somáticas. A condutividade elétrica e o CMT têm relação com a presença de infecção intramamária, mas o diagnóstico da doença deve ser confirmado pelo exame microbiológico do leite quartos mamários de búfalas. A associação dos métodos de triagem pode ser uma escolha assertiva para os programas de controle e prevenção da doença em rebanhos bubalinos.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, CCS, glândula mamária, leite, teste diagnóstico

INTRAMAMMARY INFECTION AND SCREENING TESTS STUDY FOR THE SUBCLINICAL MASTITIS DETECTION IN BUFFALOES

ABSTRACT - Mastitis is the disease that causes the most quantitative and qualitative losses in milk production systems in the world. Disease prevention and control need to involve practical and efficient actions that may help on decision-making on farm. Screening methods applied for mastitis diagnosis in dairy buffaloes are those developed specifically for cows. Thus, the objective of the thesis was to study subclinical mastitis in buffaloes and to evaluate the screening methods that help the disease diagnosis in farm. The work is divided into four chapters that deal with: reviewing the literature on the themes (I); to characterize breast milk with and without intramammary infection and to evaluate the association between the presence of intramammary infection and microbiological characteristics of buffalo milk, teat position, and the results of screening methods (II); and evaluate the *California Mastitis Test* (CMT), Somaticell (SO) and electrical conductivity (EC) rapid tests as a screening method to assist the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes on farm (III). The work was developed in a buffaloes commercial herd in the Rio Grande do Norte state. A total of 533 randomly selected milk samples were obtained and submitted to electronic somatic cell count (SCC), screening tests (CMT, SO and EC) and microbiological examination for diagnosis of subclinical mastitis (IMM: positive/negative), infection classification (negative, contagious, environmental, mixed and opportunistic) and microorganism involved (negative, individual or mixed). Descriptive analyzes were performed by frequency distribution and measures of position, dispersion and distribution of data to samples characterize. Associative analyzes were also performed by the generalized linear model and chi-square test to verify the dependence and correspondence between the screening methods, SCC and the presence of intramammary infection. The evaluation of screening methods was obtained by estimates of estimates of sensitivity, specificity, accuracy and agreement (kappa coefficient) and the ROC curve. SCC was taken as a reference for the differentiation of the high and low SCC, considering four cutoff points (150, 200, 280 and 400 x1000 cells/mL) and different criteria for the classification of the fourth breast by the methods - "Traces, 1+, 2+ and 3+" and "1+, 2+ and 3+" (CMT); SO $\geq$ 150, 200 and 400 thousand cells/mL; and EC $\geq$ 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 mS/cm. Most of the mammary quarters evaluated had up to 400 x1000 cells/mL. Positive reactions to CMT occurred in 59.29% of the mammary quarters evaluated, with the 1+ reaction being the most frequent among positive ones. 46.72% of the mammary quarters presented CCS above 400 x1000 cells/mL by the SO test. The CEL of 49.34% of the breast quarters was greater than 4.5 mS/cm. The average CCS, SO and CEL were 1,104.90 and 675.95 x1000 cells/mL and 4.88 ms/cm, respectively. Intramammary infection was diagnosed in 68.73% of the mammary quarters investigated, and half (50.55%) were infected by only one species of microorganism. Most cases of positive IMM were contagious (47.62%), mainly by *Corynebacterium bovis* and *Streptococcus agalactiae*, followed by environmental (30.69%), mainly *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterococcus* spp.; and opportunistic (19.58), represented by *Staphylococcus* spp. negative coagulase. There was significant variation in SCC in CMT, SO and EC classes. Highly significant correspondence was found between CMT and SO. There is no association between SCC, quarter position, presence of infection,

type of infection and microorganism. There is an association between the variation of CE and the presence of IMM and agreement between it and the results of CMT. The CMT trace reaction criterion was better to select the breasts with SCC from 150 and 200 x1000 cells/mL. For less rigorous screening, with SCC at cutoffs 280 and 400 x1000 cells/mL, the best CMT evaluation was the criterion that does not consider the trace reaction. The best evaluations for the Somaticell test at the cutoff points at 150 and 200 x1000 cells/mL were at criteria ≥ 200 , and at 280 and 400 x1000 cells/mL at criteria ≥ 400 . The critical values of the SO and EC that maximize the ability to correctly detect the buffaloes quarter with 150, 200, 280 and 400 x1000 cells/mL SCC are 253 (244 - 263), 363 (340 - 379), 398 (379-418) and 477 (470-485) x1000 cells/mL, respectively, and 4.5 mS/cm. Screening methods on farm assist in the identification of mammary quarters with high SCC. EC and CMT are related to the presence of intramammary infection, but the diagnosis of the disease should be confirmed by microbiological examination. The combination of screening methods can be an assertive choice for disease control and prevention programs in buffalo herds.

Keywords: *Bubalus bubalis*, diagnostic, mammary gland, milk, SCC

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acurácia do teste
ACP	Análise de Componentes Principais
ASS	Assimetria observada para a variável
AUC	<i>Area Under Curve</i> (área sob a curva)
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEL	Condutividade Elétrica do Leite
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CUR	Curtose observada para a variável
CV	Coeficiente de variação
DCC	Direct Cell Counter
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
fr_i	Frequência relativa
f_i	Frequência absoluta
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FN	Proporção de casos falso-negativos
FP	Proporção de casos falso-positivos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	International Dairy Federation
IMM	Infecção Intramamária
ISOL	Tipo de microrganismos isolados
κ	Coeficiente Kappa
MAX	Valor máximo da variável
MED	Mediana da variável
MIN	Valor mínimo da variável
P_e	Proporção de concordâncias esperadas
P_o	Proporção de concordâncias observadas
Q1	Quartil inferior observado para a variável
Q3	Quartil superior observado para a variável
ROC	<i>Curve Receiver operating characteristic</i> (curvas de característica de operação do receptor)
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
S_e	Sensibilidade do teste
S_p	Especificidade do teste
SO	Teste Somaticell
TINF	Tipo da infecção intramamária
VN	Proporção de casos verdadeiro-negativos
VP	Proporção de casos verdadeiro-positivos

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Intensidade de reação, interpretação e escore dos resultados do <i>California Mastitis Test</i> de acordo com a reação do leite ao reagente.	15
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Distribuição (%) de frequências das amostras de leite de búfalas (n=533) em relação às classes de contagem eletrônica de células somáticas (CCS), teste Somaticell, <i>California Mastitis Test</i> e condutividade elétrica.	35
Tabela 2. Medidas de posição, dispersão e distribuição da contagem eletrônica de células somáticas (CCS, em mil céls/mL), teste Somaticell (SO, em mil céls/mL) e condutividade elétrica (CEL, em ms/cm) de amostras de leite de búfalas (n=533).	36
Tabela 3. Distribuição (%) de frequências das amostras de leite de búfalas (n=275) em relação à posição do quarto mamário e exame microbiológico.	37
Tabela 4. Número e proporção do microrganismo de acordo com o tipo da infecção (contagiosa, ambiental, mista ou oportunista) identificada nas amostras de leite de búfalas positivas no exame microbiológico (n=189).	38
Tabela 5. Número e proporção do microrganismo de acordo com o tipo do isolamento (individual ou misto) identificado nas amostras de leite de búfalas positivas no exame microbiológico (n=189).	39
Tabela 6. Associação da contagem eletrônica de células somáticas do leite (CCS) de acordo com as classes do teste Somaticell, <i>California Mastitis Test</i> e condutividade elétrica nas amostras de leite de búfalas (n=533).	41
Tabela 8. Associação da contagem eletrônica de células somáticas do leite (CCS) de acordo com a posição do quarto mamário e exame microbiológico (n=275).	43
Tabela 9. Associação entre a contagem de células somáticas Somaticell e condutividade elétrica das amostras de leite de búfalas com infecção intramamária (IMM) negativa e positiva (n=275).	44

Tabela 10. Correspondência entre a presença da infecção intramamária (IMM) e a proporção dos resultados nas classes de Somaticell, <i>California Mastitis Test</i> e condutividade elétrica das amostras de leite de búfalas com infecção intramamária (IMM) negativa e positiva (n=275).....	45
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Avaliação do <i>California Mastitis Test</i> (CMT) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).....	55
Tabela 2. Avaliação do teste Somaticell (SO) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).	56
Tabela 3. Avaliação da condutividade elétrica (CEL) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Distribuição do efetivo bubalino nas regiões brasileiras (IBGE, 2019).2
- Figura 2.** Quadro para análise dos resultados do método alternativo e relação ao método clássico ou referência.18

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Histogramas da contagem eletrônica de células somáticas, teste Somaticell, California Mastitis Test e condutividade elétrica.36
- Figura 2.** Histogramas da posição do quarto mamário, condição da infecção intramamária, tipo de isolado e da infecção (n=275).37

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Curvas ROC do teste Somaticell (SO, —) e condutividade elétrica (CEL, ---) triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas com alta CCS, considerando quatro diferentes pontos de corte da contagem de células somáticas - 150 (A), 200 (B), 280 (C) e 400 (D) mil céls/mL60

APENDICE

- Figura 1.** Principais pontos da rotina de ordenha em sistema rotatório com capacidade para 40 búfalas – Sala de espera (A), detalhe do portão automático para acesso da cabine na plataforma rotatória (B), procedimento de higiene pré-ordenha (C), animais durante a ordenha (D); aplicação de solução pós-ordenha (E); e saída do animal com a plataforma em movimento (F)..... 69
- Figura 2.** Métodos de triagem realizados em laboratório – California Mastitis Test (A e B), teste Somaticell (C) e condutividade elétrica (D). 70
- Figura 3.** Tubo com graduação de valores fixos usado para realização e leitura dos resultados do teste Somaticell (Somaticell, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). 70

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A saúde da glândula mamária de fêmeas leiteiras é um elemento de grande importância para fazendas de produção de leite. A infecção intramamária (IMM) consiste na invasão da glândula principalmente por bactérias que está associada a perdas quantitativas e qualitativas no leite, aumento do custo de produção e descarte involuntário de animais, dentre outros prejuízos (Singh e Singh, 1994; Tripaldi et al., 2003; Tripaldi et al., 2010; Ruegg e Pantoja, 2013). Por isso, as fazendas leiteiras de todo o mundo adotam programa de prevenção e controle da doença.

A mastite é uma doença causada pela inflamação da glândula mamária em decorrência da invasão por microrganismos, injúrias externas ou processo fisiológico natural (estresse). Apesar de as fêmeas bubalinas serem mais resistentes à IMM em relação às fêmeas bovinas, a literatura tem reportado que aquelas também são acometidas pela doença (Tripaldi et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Sollecito et al., 2011; Purohit et al., 2014; Kashyap et al., 2019).

A condição da saúde intramamária é confirmada pelo exame microbiológico do leite, que indica a presença de processo infeccioso. Quando está instalada uma IMM, as células de defesa (somáticas) são recrutadas para o local, principalmente os neutrófilos, o que aumenta a sua proporção no leite (Bastos, 2004; Tripaldi et al., 2010; Pizauro, 2013). A contagem de células somáticas (CCS) é usada, então, para acompanhar a resposta imunológica do animal frente ao processo infeccioso. Os métodos de triagem se baseiam na contagem direta ou indireta destas células no leite, dando indícios da presença de mastite subclínica. Ainda não existe uma concordância sobre o limite crítico de CCS e do método de triagem que indica corretamente a presença de mastite subclínica em búfalas.

De maneira geral, os estudos evidenciam baixas a médias contagens de células somáticas no leite e relatam pouca prevalência de mastite em rebanhos bubalinos (Mustafa et al., 2013; Purohit et al., 2014; Elhaig e Selim, 2015), o que não elimina a necessidade de se estudar melhor a doença na espécie.

No sentido de contribuir para um melhor entendimento sobre a doença e ferramentas de monitoramento para sua prevenção e controle na fazenda, o objetivo

geral da tese foi desenvolver um estudo sobre a mastite subclínica e avaliar os métodos triagem para o diagnóstico da doença em quartos mamários de búfalas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bubalinocultura leiteira

O búfalo doméstico é originário da Ásia, pertence ao gênero *Bubalus* e espécie *bubalis*, família *Bovidae* e subfamília *Bovinae*. Sua domesticação ocorreu há 5 mil anos, mais recente que a domesticação dos bovinos *Bos Taurus* e *Bos indicus*, que ocorreu há 10 mil anos (Borghese e Mazzi, 2005).

O continente asiático detém de 97,4% do rebanho bubalino mundial, seguido da África (1,7), Américas (0,7) e Europa (0,2), sendo o Brasil o país que possui a maior população bubalina em toda a América, cerca de 1,3 milhões de cabeças (FAO, 2019).

O início da criação de búfalos no Brasil ocorreu por volta do ano 1980, em diversas regiões do país (Bernardes, 2007). Estima-se que no Brasil o efetivo do rebanho bubalino é de 1.381.395,00 cabeças (IBGE, 2019), destinadas à produção de carne ou leite, dependendo da região do país. A maior parte do efetivo encontra-se na região Norte do Brasil, principalmente no estado do Pará; seguindo-se nas regiões Sudeste, onde se encontra a maior concentração de explorações leiteiras, principalmente no estado de São Paulo; Nordeste, principalmente no litoral e estado do Maranhão; Sul, principalmente no Rio Grande do Sul; e Centro-Oeste, principalmente no estado do Goiás (IBGE, 2019) (Figura 1).

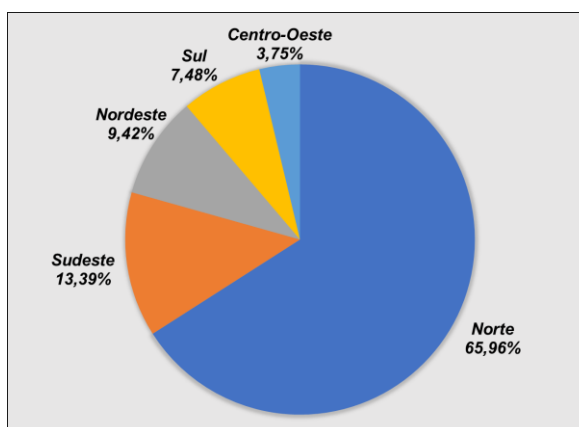


Figura 1. Distribuição do efetivo bubalino nas regiões brasileiras (IBGE, 2019).

A partir dos anos 90, houve um aumento no número de indústrias brasileiras voltadas à fabricação de produtos derivados do leite bubalino, as quais são responsáveis pelo uso de grande parte do leite produzido no país (Tonhati et al., 2011). Dois grandes fatores que contribuem para o interesse no beneficiamento do leite bubalino são as características peculiares da matéria-prima em termos de composição, que supera a concentração de sólidos (Rangel et al., 2011) e o rendimento (Teixeira et al., 2005), quando se compara com as características do leite bovino.

As fêmeas bubalinas são susceptíveis a problemas sanitários semelhantes aos de vacas, podendo ser acometidas pela mastite. Entretanto, sua resistência à infecção intramamária é maior que a bovina. Primeiramente porque a seleção genética das búfalas, especialmente em termos produtivos, ainda não alcançou o estágio já estabelecido para as vacas especializadas, o que ainda lhes confere rusticidade e menor susceptibilidade à mastite. Além disso, as búfalas leiteiras detêm de tetos mais protegidos devido a maior quantidade de melanina, queratina e vascularização (tônus) do esfíncter; assim como possuem maior concentração de lactoferrina e lactoperoxidase, que auxiliam na defesa contra os microrganismos invasores. Elas também contam com células de defesa (neutrófilos) com maior eficácia antibacteriana em relação às vacas (Kapronezai et al., 2005; Sollecito et al., 2011).

Considerando que o mercado possui uma vasta diversificação em termos de produtos lácteos e, conseqüentemente, uma concorrência significativa, a oferta de derivados do leite bubalino apresenta-se como uma maneira estratégica de a indústria se estabelecer no mercado. O diferencial da origem da matéria-prima, dá ao produto final uma essência nobre e refinada, permitindo que a indústria atenda um nicho de mercado e ofereça seus produtos com valor agregado ainda maior.

2.2 Infecção intramamária em búfalas

A inflamação dos tecidos intramamários de fêmeas leiteiras, chamada de mastite, pode se dar por ordens fisiológicas (estresse), a partir de injúrias externas e traumas no úbere e tetos, ou por invasão de microrganismos através do orifício do teto, conhecida como infecção intramamária (IMM) (Smith, 2002).

A mastite tem diferentes graus de intensidade, duração e consequências, e pode se apresentar de maneira clínica ou subclínica. A mastite clínica é uma reação inflamatória com sinais clínicos evidentes que se mostram concomitantemente ou não, como: animal apático; inchaço, alta temperatura e alteração da textura glandular; e mudança no aspecto do leite secretado, apresentando aumento de viscosidade, presença de grumos, sangue, pus ou coloração anormal (Schalm et al., 1971; Harmon, 1994). Já na mastite subclínica, o úbere não apresenta sinais visíveis de inflamação e o leite tem aparência normal. Entretanto, existe a presença de microrganismos invasores com aumento das células de defesa no leite, que também pode apresentar características físico-químicas alteradas (Schalm et al., 1971; Harmon, 1994; Alhussien e Dang, 2018).

A prevalência da mastite subclínica é maior de que a clínica (Philpot e Nickerson, 1991), e, devido sua expressão silenciosa e impacto na produtividade do rebanho e qualidade do leite e derivados, sua identificação faz parte das medidas de controle da doença.

A mastite infecciosa é a mais recorrente em rebanhos leiteiros em todo o mundo e sua instalação e duração depende do microrganismo (tipo e capacidade de colonização e persistência na glândula), do hospedeiro (magnitude e duração da resposta imune à invasão, condição fisiológica) e do ambiente (higiene e práticas de manejo para prevenção de novas infecções e combate/cura).

A invasão do úbere pelos microrganismos é conhecida como infecção intramamária (IMM). A proporção de casos positivos para a IMM nos rebanhos leiteiros é medida pela prevalência. Estudos simultâneos nas duas espécies confirmam que a prevalência e a taxa de novos casos (incidência) de IMM é menor em búfalas (Mahajan et al., 2011; Mustafa et al., 2013; Elhaig e Selim, 2015). Os estudos indicam prevalências entre 8,81 e 68,33 % em rebanhos bubalinos (Vianni et al., 1990; Kapronezai et al., 2005; Salvador et al., 2012; Mustafa et al., 2013; Pizauro et al., 2014; Kashyap et al., 2019).

As búfalas são menos susceptíveis à IMM de que as vacas, embora a infecção envolva microrganismos semelhantes em ambas as espécies (Kapronezai et al., 2005; Moroni et al., 2006; Purohit et al., 2014). Além disso, a incidência e prevalência da mastite subclínica pode ser influenciada por diferenças regionais, sazonais e

climáticas (Nyman et al., 2007) que estão relacionadas principalmente às condições ideais de proliferação bacteriana ambiental.

Os principais microrganismos que provocam mastite nos animais leiteiros são as bactérias. Mas as leveduras, fungos e até algas também podem comprometer a saúde do úbere (Smith, 2002). Esses microrganismos se agrupam em contagiosos, que são principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*; e em ambientais, representados pelas outras espécies do gênero *Streptococcus*, bactérias entéricas (coliformes), fungos e algas (Radostits et al., 2007; Bastos e Birgel, 2011; Medeiros et al., 2011).

Os microrganismos contagiosos são dependentes do animal e incapazes de sobreviver fora da glândula mamária. Eles são transmitidos de animal a animal principalmente na ordenha, por meio das teteiras, mãos do ordenhador, ou boca do bezerro. Esses microrganismos geralmente se associam à mastite subclínica e crônica, possuindo alta persistência. Já os ambientais, adentram o úbere geralmente estão presentes no solo, cama dos animais e ambientes úmidos. A mastite subclínica por patógenos ambientais tem maior prevalência quando ocorrem mudanças de temperatura e umidade, em comparação com os patógenos contagiosos (Vitolini et al., 2001). Os microrganismos ambientais provocam aumento súbito da contagem de células somáticas, com regressão em poucas semanas (Haas et al., 2004). A cura espontânea da mastite ambiental é mais fácil de que a cura da contagiosa, porque os patógenos contagiosos têm maior predileção pelo ambiente intramamário, fazendo a IMM persistir.

O principal microrganismo contagioso associado à mastite que merece rápida tomada de decisão é *Staphylococcus aureus*, porque ele provoca perdas na produção e prejuízos irreversíveis na glândula mamária de animais leiteiros (Fagiolo e Lai, 2007). Esse microrganismo possui mecanismo de resistência aos antimicrobianos, dificultando seu tratamento, e têm capacidade de produzir toxinas termoestáveis associadas à intoxicação alimentar no homem (Al-Tarazi et al., 2009; Johler e Stephan, 2010; Moura et al., 2019). *S. aureus* e os estreptococcus ambientais (*S. uberis* e *Strep. dysgalactiae*) causam infecções invasivas ao tecido mamário, são persistentes/crônicas e têm um tratamento mais difícil e demorado (Burton e Erskine, 2003).

Streptococcus agalactiae é um parasita estrito do úbere e a principal fonte de infecção é a glândula mamária de animais doentes, mas também pode ocorrer através da pele das tetas, lesões e hiperqueratose. A infecção por *S. agalactiae* ocorre superficialmente nos dutos de leite, mas causa mastite clínica e subclínica com aumento significativo de CCS e perdas consideráveis na produção de leite e também provoca altas taxas de lipólise e proteólise no leite (Fagiolo e Lai, 2007; Jorgensen et al., 2016). Ele pode sobreviver em fezes, utensílios e equipamentos de ordenha (Jorgensen et al., 2016). Por isso, o tratamento dos animais doentes, a correta higienização das mãos do ordenhador e dos materiais e equipamentos de ordenha são importantes para o controle desse patógeno.

Alguns estudos mostram que os gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. são os mais prevalentes em búfalas com IMM (Bastos e Birgel, 2011; Medeiros et al., 2011; Pizauro et al., 2014). *Corynebacterium* spp. foi o patógeno mais prevalente em búfalas durante o período chuvoso, quando também aumentou levemente a CCS, no estado de São Paulo, Brasil (Pizauro et al., 2014). Ele causa mastite subclínica leve, sem alterações evidentes na produção e qualidade do leite (Pantoja et al., 2009; Catozzi et al., 2017).

Ainda podem ser encontradas infecções por microrganismos oportunistas, como *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN), que fazem parte da microbiota natural da pele e canal do teto. Eles são uma das causas mais frequentes de mastite subclínica e as principais espécies desse grupo são *S. chormogenes* e *S. warneri*. Em rebanhos com baixa prevalência de microrganismos contagiosos, os SCN passam a prevalecer, mas não provocam uma resposta não intensa de CCS e têm alta taxa de cura espontânea (Schukken et al., 2009; Condas et al., 2017). SCN e *Corynebacterium bovis* produzem substâncias antibacterianas que podem inibir por competitividade as infecções pelos demais patógenos, protegendo a glândula mamária (Biggs, 2009).

Rebanhos com mastite contagiosa controlada ou que passam a conviver com condições ambientais inadequadas (problemas de cama, manejo de ordenha, alta umidade em piquetes e salas de ordenha) desenvolvem geralmente a mastite ambiental, que se apresenta principalmente como clínica e com alta CCS (Dhakal, 2006). Os coliformes, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., juntamente

com os *Streptococcus uberis* e *Strep. dysgalactiae*, são os principais representantes do grupo ambiental. Mas também podem ser encontradas infecções ambientais por *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Aerococcus viridans*, e *Lactococcus lactis* (Bobbo et al., 2017).

Fêmeas leiteiras estão submetidas a fatores ambientais desafiadores que lhes expõem à IMM tanto durante a lactação, quando durante o período seco. Esses fatores estão relacionados principalmente ao clima, às instalações e ao manejo (Harmon, 1994; Bastos e Birgel, 2011; Pizauro, 2013), que devem ser considerados nas ações para o controle e prevenção da mastite no rebanho.

A resposta do animal frente a IMM depende de sua espécie, raça, ordem de parto, período de lactação, nível de produção, magnitude e duração da resposta imune e do tipo de microrganismo envolvido na doença (Harmon, 1994; Bastos e Birgel, 2011; Rhoda e Pantoja, 2012; Pizauro, 2013; Alhussien e Dang, 2018).

2.2.1 Contagem de células somáticas

A expressão “células somáticas” se refere às células derivadas do corpo do animal que estão presentes no leite. A maioria das células somáticas do animal saudável são glóbulos brancos do sangue - os leucócitos (linfócitos, macrófagos e neutrófilos). Também são encontradas em menor proporção as células resultantes da regeneração epitelial pela descamação normal do tecido alveolar e dos ductos da glândula mamária (Tripaldi et al., 2010; Alhussien e Dang, 2018).

A presença das células somáticas no leite é um fenômeno fisiológico normal, pois elas representam a segunda barreira para a defesa do úbere contra microrganismos invasores, sendo a primeira barreira a estrutura anatômica (epitélio do teto, esfíncter, etc.) e fatores químicos (citocinas) (Alhussien e Dang, 2018).

Uma vez instalada a IMM por microrganismos, mais células de defesa do animal são recrutadas para o interior do úbere para combatê-los e aumentam de proporção, indicando a condição de saúde do úbere. Por isso, a contagem de células somáticas (CCS) no leite consiste atualmente na ferramenta mais usual para aferir a saúde da glândula mamária de fêmeas lactantes.

Apesar de as fêmeas bubalinas possuírem mecanismos de defesa da glândula mamária que as permitem uma melhor resposta frente à IMM em relação às vacas, a

literatura tem reportado que estas também são acometidas pela doença na sua forma clínica e subclínica (Tripaldi et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Sollecito et al., 2011; Purohit et al., 2014; Kashyap et al., 2019). Entretanto, os valores de referência utilizados para CCS de leite bovino mostram-se inadequados para búfalas (Amaral et al., 2005; Medeiros et al., 2011), o que pode estar ligado às diferenças nas características anatômicas e fisiológicas relacionadas à glândula mamária das duas espécies.

Os valores médios para a CCS no leite de búfalas podem variar de acordo com diversos fatores como a idade animal, a fase de lactação, a estação do ano, clima, dentre outros (Céron-Muñoz, 2002; Rangel et al., 2011; Salari et al., 2013; Moura et al., 2017). De maneira geral, os estudos evidenciam baixas a médias contagens de células somáticas e relatam pouca prevalência de casos clínicos em rebanhos bubalinos (Céron Muñoz et al., 2002; Tripaldi et al., 2003; Kapronezai et al., 2005, Pardo, 2007; Purohit et al., 2014), mas isso não elimina a necessidade de se estudar melhor a doença em rebanhos da espécie.

Bastos (2004) e Pizauro (2013) identificaram maior proporção de neutrófilos, em relação aos linfócitos e macrófagos em amostras de leite de búfalas com IMM, como também acontece em vacas. Tripaldi et al. (2010) observaram que o incremento de CCS no leite de búfalas acima de 100 mil céls/mL é diretamente relacionado ao aumento na proporção de neutrófilos e na redução de linfócitos.

O leite obtido de um quarto mamário saudável tem CSS abaixo de 100 mil céls/mL para vacas, que são diagnosticadas com mastite subclínica com a CCS a partir de 200 mil céls/mL (Smith, 2002), valor também constatado no leite de búfalas com IMM no estudo de Dhakal (2006). Segundo Medeiros et al. (2011), valores de CCS acima de 280 mil céls/mL são um indicativo de infecção da glândula mamária em búfalas. Mas, segundo Rhoda e Pantoja (2012), espera-se que muitas amostras de leite com CCS maior que 200 mil céls/mL usadas para determinar a presença e tipo da IMM sejam provavelmente negativas. A redução da CCS até abaixo de 200 mil céls/mL acontece gradualmente após a cura espontânea ou o tratamento, e o tempo para normalizar depende muitas vezes das espécies de microrganismos envolvidos na IMM (Ruegg, 2013). Por isso, os estudos e ações sobre a CCS e a IMM devem ser

cautelosos e devem considerar a realidade de cada rebanho e o tipo de colheita de dados utilizado (se dados históricos ou pontuais, por exemplo).

2.3 Prejuízos causados pela mastite

A mastite pode provocar prejuízos cumulativos e irreversíveis na glândula mamária devido a atrofia e necrose do tecido secretor, incluindo relevantes perdas qualitativas do leite e seus derivados (Harmon, 1994; Céron-Muñoz et al., 2002). Estima-se que a mastite subclínica causa perdas econômicas consideráveis, uma vez que ela atua de forma silenciosa na maior parte do rebanho, reduzindo a produção e qualidade de leite (Singh e Singh, 1994; Tripaldi et al., 2003; Tripaldi et al., 2010; Ruegg e Pantoja, 2013).

As perdas pela mastite em búfalas são de aproximadamente 17,5% na produção de leite, sendo os quadros severos responsáveis pela redução diária de 0,35 litros de leite por animal (Singh e Singh, 1994). Somam-se a isso os custos com tratamento, o descarte de leite devido as alterações em suas características normais ou pelo resíduo de antibióticos, além da perda do animal por descarte involuntário ou morte. Existem ainda os prejuízos potenciais para o consumidor, pois o leite de animal acometido pela infecção pode ser um veículo de microrganismos e suas toxinas capazes de desencadear doenças em humanos. Por esses motivos, a mastite é a doença que mais causa prejuízos aos sistemas de produção de leite mundiais (Ruegg e Pantoja, 2013; Purohit et al., 2014).

A elevação na CCS está diretamente relacionada ao decréscimo na produtividade, alterações na composição química do leite (gordura, lactose e caseína); na atividade enzimática e, portanto, nas propriedades de coagulação durante a produção de derivados (Céron-Muñoz et al., 2002; Montanhini et al. 2013). Tripaldi et al. (2010) identificaram que as búfalas com CCS maior que 200 mil céls/mL possuíam maior Contagem Bacteriana Total (666 mil UFC/mL), e menor produção de leite, quando comparadas com as búfalas com CCS abaixo de 200 mil céls/mL.

O cuidado com os níveis de CCS do leite também tem como foco evitar prejuízos na síntese dos componentes do leite (Céron-Muñoz et al., 2002; Tripaldi et al., 2003), resguardar a segurança e vida de prateleira do alimento (Mazal et al., 2007; Sollecito et al., 2011), atenuar os efeitos de aumento do tempo de coagulação do leite (Tripaldi

et al., 2003; Mazal et al., 2007) e perda de gordura e proteína no soro de queijos (Andreatta et al., 2009); além também de minimizar efeito negativo sobre o rendimento, propriedades sensoriais e aceitabilidade do produto final (Tripaldi et al., 2003; Montanhini et al., 2013; Coelho et al., 2014; Sales et al., 2016).

Tripaldi et al. (2003) tiveram evidências de que o uso de leite bubalino com até 200 mil céls/mL garantem as suas propriedades tecnológicas, principalmente coagulação, ideais para a ótima eficiência de fabricação de derivados. Esse é o mesmo valor de CCS adotado como limite pelas indústrias na Itália, onde o leite de búfalas é em sua maior parte empregado na produção de mozzarella.

Este assunto deve ter, portanto, a merecida atenção, já que os prejuízos causados pela doença em questão são de extrema relevância para a bubalinocultura e para a indústria láctea (Céron-Muñoz et al., 2002; Kapronezai et al., 2005; Medeiros et al., 2011; Purohit et al., 2014).

2.4 Programa de controle de mastite

As fêmeas leiteiras estão diariamente expostas à inflamação intramamária. A eliminação completa dos microrganismos do ambiente onde os animais são criados é inviável, na prática. Como toda doença, a IMM provoca a resposta do sistema imune e o constante contato do animal com o microrganismo estimula a manutenção dessa resposta defensiva, deixando-o preparado para rápida resposta em caso de infecção aguda. A resposta imune e a cura da infecção dependem primordialmente desse feedback do próprio organismo animal, e, não exatamente da eficiência de químicos usados no tratamento (Ruegg e Pantoja, 2013). Assim, é desejável que o sistema imune dos animais responda ativamente no combate à invasão de microrganismos para a cura espontânea da IMM. Essa resposta pode ter como consequência a oscilação na contagem de células somáticas no leite ao longo da lactação, com ocorrência de picos seguidos de diminuição. Nessa conjuntura, é importante que os rebanhos convivam com a presença da mastite e em baixa prevalência (< 30%).

Essa dinâmica de resposta animal e a gestão das informações obtidas no acompanhamento do rebanho, além das práticas preventivas e de tratamento são importantes para o controle da doença. Informações importantes tomadas subsequentemente e as revisões mensais do histórico de cada animal, como número

de casos curados, novos casos e casos crônicos, prevalência e incidência devem ser consideradas para avaliar a saúde do rebanho (Rhoda e Pantoja, 2012; Ruegg e Pantoja, 2013). Somente o dado pontual de CCS referente a apenas um mês, por exemplo, não é suficiente para o diagnóstico completo e a tomada de decisões adequada sobre a IMM.

O conselho americano de mastite (*National Mastitis Council*) orienta as práticas de manejo estratégicas para o controle eficaz da doença no rebanho. Essas práticas são adotadas amplamente para vacas e se baseiam em: I) procedimentos adequados de desinfecção dos tetos antes e após ordenha (pré e pós-dipping); II) cuidados preventivos em todas as vacas secas (antibioticoterapia); III) tratamento dos casos clínicos e registro de todos os casos; IV) separação e descarte dos animais que sofreram muitos casos de mastite clínica (crônicos); V) manutenção adequada do equipamento de ordenha (Jorgensen et al., 2016). Além disso, Ruegg e Pantoja (2013) sugerem outros pontos práticos na implementação dos programas de controle de mastite – a) os produtores devem trabalhar com sua equipe para desenvolver um plano anual de saúde do úbere que inclua metas claras para a qualidade do leite, garanta a prevenção de novas infecções (incluindo a limpeza e conforto das instalações), e a identificação e monitoramento de vacas cronicamente infectadas. O gerenciamento incisivo da IMM é extremamente eficaz para ajudar as fazendas atenderem aos padrões da indústria para a qualidade do leite e segurança alimentar.

A intensificação de procedimentos de higienização pré-ordenha é essencial para reduzir o risco de IMM ambiental e de contaminação do leite de búfalas que têm contato com poças de água ou lamas. Para a remoção de sujeiras, Borguese et al. (2007) relatam que algumas fazendas da Itália utilizam uma piscina com água limpa para que as búfalas mergulhem na entrada da sala de pré-ordenha; outra opção é a utilização de aspersores antes da ordenha. Eles recomendam que essa forma de limpeza deve estar associada à secagem dos tetos posteriormente, para evitar a drenagem de bactérias para dentro do teto.

A maior parte do leite produzido pelas búfalas fica armazenado em nível alveolar e, se não estiverem bem induzidas à liberação, algumas podem demorar na ejeção do leite, mesmo se ordenhadas por até 15 minutos (Borguese et al., 2007). Nessa situação, os tecidos do úbere e do teto sofrem estresse por pressão mecânica durante

período prolongado, o que pode levar a prejuízos no esfíncter (hiperqueratose), uma das barreiras físicas da mastite. Em razão disso, recomenda-se uma indução da ejeção de leite adequada pela presença do bezerro, contato tátil/manual ou alimentação na ordenha. Pode ser considerada a aplicação de uma dose fisiológica de ocitocina exógena em búfalas que apresentam dificuldade de responder aos demais estímulos, entretanto, o mais aconselhável é incluir essa característica na seleção dos animais da fazenda (Borguese et al., 2007).

2.5 Métodos de avaliação da saúde da glândula mamária

O diagnóstico de mastite é baseado em sinais clínicos e exames laboratoriais. O teste de Tamis é o método que permite, na fazenda, a identificação rápida de animais com mastite clínica. Ele é empregado na rotina de cada ordenha e consiste na análise visual dos primeiros jatos de leite em uma caneca de fundo escuro (Kapronezai et al., 2005). O animal com mastite clínica apresenta o leite com grumos, secreção purulenta e/ou sanguinolenta no momento do teste e também pode apresentar sinais clínicos na textura glandular, inchaço e vermelhidão.

Uma vez que a quantidade e proporção de células de defesa se relaciona diretamente com a infecção e as reações inflamatórias intramamárias em fêmeas leiteiras, a contagem de células somáticas (CCS) é uma ferramenta prática para se acompanhar a saúde da glândula mamária dos animais em lactação, indicar os casos de mastite subclínica e é um subsídio para tomada de decisões na fazenda que adota o programa de controle da doença (Moroni et al., 2006; Araújo et al., 2012). A CCS não diagnostica a infecção, mas sim, a resposta inflamatória do sistema imune na glândula mamária. Somente o exame microbiológico do material secretado pelo úbere comprova a instalação de patógenos no local e o diagnóstico da doença.

Medeiros et al. (2011) indicam que o exame microbiológico do leite é o melhor método para diagnóstico da mastite subclínica em búfalas, porque como as fêmeas bubalinas têm uma resistência maior à infecção mamária, é comum observar animais com alta CCS sem um quadro infeccioso. Por isso, a cultura bacteriana é o método indicado para diagnóstico definitivo da mastite nesta espécie, que direcionará a decisão para tratamento e manejo dos animais.

As técnicas de cultivo microbiológico exigem mais tempo e cuidados para a colheita, preparo e análise do material e são mais onerosas em relação à contagem de células somáticas. Diante disso, as fazendas que adotam programas de controle de mastite usam métodos de triagem dos animais antes de submetê-los ao método diagnóstico (exame microbiológico). Esses métodos de triagem se baseiam na contagem direta ou indireta de células somáticas no leite.

Como ocorre nas vacas, alterações celulares também estão relacionadas com a presença de IMM em quartos mamários de búfalas. Mas ainda não existe uma concordância sobre o limite crítico de CCS e do método de triagem que indica a presença de mastite em búfalas.

Os valores abaixo de 100 mil céls/mL ocorrem sempre em búfalas saudáveis (Tripaldi et al., 2010). Sharma et al. (2007) identificaram caso de mastite clínica com CCS em 280 mil céls/mL. Alguns autores adotam 200 mil céls/mL como o limite crítico para identificar búfalas com possível mastite subclínica (Moroni et al., 2006; Tripaldi et al., 2010; Sollecito et al., 2011). Diferentemente destes, Medeiros et al. (2011), confrontando resultados (n=1986) do *California Mastitis Test*, CCS e exame microbiológico de leite bubalino na região nordeste do Brasil, chegaram à conclusão de que uma búfala é diagnosticada com mastite subclínica quando o leite tem a partir de 280 mil céls/mL.

Como a mastite subclínica é silenciosa, o diagnóstico precisa ser auxiliado por testes de triagem. Esses testes se baseiam na contagem direta ou indireta de células somáticas no leite, dando indícios da presença de mastite subclínica, que é posteriormente confirmada por método diagnóstico microbiológico (Fagiolo e Lai, 2007).

2.5.1 Métodos diretos

Os métodos existentes atualmente para a contagem de células somáticas já foram largamente testados para o leite da espécie bovina, tradicionalmente produzido no mundo inteiro. O método clássico é o de contagem direta das células presentes no leite através de microscopia (Schalm et al., 1971), reconhecido como método padrão para CCS pelo International Dairy Federation (ISO 13366-1|IDF 148-1:2008), e utilizado para calibrar os demais métodos. Este método estima a quantidade de

células a partir de 10 µL de leite (0,01mL) em lâmina. A contagem direta microscópica consome tempo, depende da subjetividade humana e é tediosa, o que culmina em uma precisão insatisfatória do método (Orlandini e Bijgaart, 2011).

Com o advento das tecnologias, surgiram métodos eletrônicos auxiliados por computador para a contagem direta de células somáticas, o que facilita o acompanhamento e controle da saúde do rebanho com alta precisão.

O método automatizado de contagem direta mais usado atualmente é o fluoro-opto-electronico (ISO 13366-2|IDF 148-2:2006), ou de citometria de fluxo, que contabiliza eletronicamente por fluorescência e impulsos elétricos as células inteiras, com núcleo íntegro, presentes no leite e fornece a informação por interface computadorizada (IDF,1995). Esse método se baseia na técnica de coloração fluorescente (com brometo de etídio) do DNA das células presentes em 50 µL de leite (0,05mL) que passam uma a uma por um laser em feixe, emitem pulsos fluorescentes que são captados por um sistema óptico e traduzidos em contagem celular (Bentley..., 1997).

Esse é um método de rotina aplicado em todo o mundo para a análise de um vasto número de amostras, porque ele permite um elevado rendimento analítico (amostras/hora) com alta precisão e facilidade de análise (Orlandini e Bijgaart, 2011). O investimento inicial do equipamento é alto e a sua calibração requer uso de amostras padronizadas que tem um acesso dificultoso (Orlandini e Bijgaart, 2011).

O custo de investimento na aquisição e a manutenção de equipamentos dificulta o seu uso diretamente na fazenda, então existem laboratórios que recebem as amostras das fazendas e viabilizam a execução das análises. Os equipamentos mais conhecidos são o Direct Cell Counter (DCC) (DeLaval International AB, Tumba, Sweden), Fossomatic (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca) e Somacount FC (Bentley Instruments, Chaska, EUA).

2.5.2 Métodos indiretos

Com uma maior preocupação em se acompanhar rotineiramente a saúde da glândula mamária dos animais, também foram desenvolvidos métodos que viabilizam a investigação diretamente na fazenda, de forma menos onerosa e mais prática, em relação às análises para contagem direta de células somáticas. Estes consistem em

testes de estimacão do número de células somáticas e do grau de inflamação, baseados em reações de viscosidade e na eletrocondutividade do leite.

2.5.2.1 *California Mastitis Test*

Schalm e Noorlander (1957) desenvolveram o *California Mastitis Test* (CMT) que há muitos anos  empregado nas fazendas como método de triagem para detecção de mastite subclínica. Esse teste  baseado no *Wisconsin Mastitis Test* proposto Thompson e Postle (1964) e se fundamenta na reação entre uma solução e os ácidos nucleicos das células presentes no leite, que resulta em um material mais espesso quanto maior for a quantidade celular. O CMT consiste na mistura do leite a um reagente composto por substância detergente – violeta ou púrpura de bromocresol que expõe e coagula o material nuclear das células, provocando uma reação de líquida (aspecto normal do leite) a gelatinosa (Schalm e Noorlander, 1957).

O caso de mastite subclínica  identificado pelo CMT a partir do limiar de traços (suspeita), ou escore 1 (reação leve) até o escore 4 (Fosgate et al., 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Intensidade de reação, interpretação e escore dos resultados do *California Mastitis Test* de acordo com a reação do leite ao reagente.

Reação		Interpretação	Escore
Negativa	Sem formação de gel após agitação	-	0
Suspeita	Líquido com ligeira precipitação, escorre com facilidade, mas sem aspecto gelatinoso	Traços	1,0
Positiva fraca	Líquido coagulado, escorre ligeiramente viscoso, com ligeiro aspecto gelatinoso	1+	2,0
Positiva moderada	Líquido coagulado, escorre muito viscoso, aspecto de gel espesso	2+	3,0
Positiva forte	Líquido completamente coagulado, aderente e gelatinoso	3+	4,0

Adaptado de Schalm e Noorlander (1957).

A faixa de CCS encontrada para cada escore de CMT tem uma variabilidade alta, não demonstrando uma relação direta forte entre o valor de CCS e o escore de CMT (Langoni et al., 2012). O resultado do CMT depende da interpretação subjetiva da pessoa que executa e a dificuldade de correspondência entre a CCS e o CMT fornece uma proporção de resultados falso-negativos (Fosgate et al., 2013).

Sharma et al. (2007) identificaram dois quartos mamários de búfalas com CCS de 280 mil céls/mL e de 3.100 mil céls/mL, na posição posterior esquerda e direita, respectivamente, tendo o primeiro uma intensidade de reação ao CMT de 1+ e o

segundo de 3+, indicando que o CMT pode auxiliar a identificação de búfalas com mastite instantaneamente na fazenda.

2.5.2.2 Teste Somaticell

O mais recente teste por viscosidade empregado nas fazendas é o Teste Somaticell (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA), método adaptado do CMT, que consiste na mistura do reagente ao leite, dentro de um tubo graduado em níveis de 69 a 1970 céls/mL, permitindo a leitura direta do resultado. O valor estimado de CCS corresponde ao nível em que se encontra o conteúdo do tubo. Ele foi objeto de estudo em várias pesquisas com vacas (Rodrigues et al., 2009; Araújo et al., 2012; Langoni et al., 2012; Pereira Neto et al., 2014; Rossi et al., 2018) e supera a praticidade e precisão do CMT, tendo em vista que o resultado é lido em uma escala numérica, dispensando interpretação subjetiva. A limitação deste teste é que sua utilização requer padronização em todos os momentos da análise, exigindo que o protocolo indicado pelo fabricante seja seguido nos mínimos detalhes, incluindo contagem de tempo cronometrado. Além disso, todo o material fica inutilizável e deve ser descartado após o teste, o que contribui negativamente para a geração de resíduos sólidos para o meio ambiente.

2.5.2.3 Condutividade elétrica do leite

Outro método de triagem prático que pode ser adotado para auxiliar no diagnóstico da mastite é a determinação da condutividade elétrica do leite (CEL) e seu uso remonta da década de 40 (Norberg, 2005). Quando da instalação de processo infeccioso, a permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula fica prejudicada, desequilibrando as concentrações de íons que entram para os alvéolos e são secretados no leite. O método de triagem dos animais pela condutividade elétrica se baseia na mensuração da corrente elétrica do leite derivada desses íons, principalmente cloro, sódio e potássio (Santos e Fonseca, 2007).

A CEL pode ser mensurada em aparelho portátil, simples e de custo acessível, como também por meio de sensores acoplados à linha de ordenha em sistemas automáticos, permitindo aferição a cada ordenha com aplicação para segregação de animais ou do leite ordenhado de acordo com o valor de CEL. A CEL se apresenta

como um método viável para triagem dos animais na fazenda, devido a praticidade da sua leitura.

Tripaldi et al. (2010) identificaram que as búfalas com CCS maior que 200 mil céls/mL possuíam maior quantidade de cloretos (0,882 mg/mL) em relação às búfalas com CCS abaixo de 200 mil céls/mL.

Bastos e Birgel (2011) encontraram valores médios de 29 e 105 mil céls/mL e de 4,05 e 4,62 mS/cm para contagem de células somáticas e condutividade elétrica do leite de quartos mamários sem e com IMM, respectivamente. Já Hussain et al. (2012) identificaram que a condutividade média do leite de búfalas sadias e acometidas pela mastite foi de 4,9 e 6,1 mS/cm, respectivamente. Moura et al. (2017) encontrou maior condutividade (3,24 mS/cm) no leite dos animais incluídos no grupo de maior CCS (685 mil céls/mL), em comparação ao grupo de menor CCS (470 mil céls/mL; 3,09 mS/mL).

2.5.3 Acurácia diagnóstica

Canaes (2004) inferiu que o método automático por citometria de fluxo subestimou a CCS do leite bubalino em 45,8%, quando comparado ao método de contagem microscópica. Entretanto, o estudo obteve uma correlação de 0,95 ($n = 82$) entre os dois métodos. Já Malavolta (2006) viu que a CCS eletrônica subestimou a contagem microscópica em 30,67% e que os métodos tinham uma correlação baixa de 0,32 ($n = 378$). Tripaldi et al. (2010) também observaram diferença entre os métodos, em que a média de CCS realizada por microscopia foi de 314 mil céls/mL e por citometria de fluxo, 250 mil céls/mL (subestimando em 20,4% a CCS microscópica).

Ao contrário dos três estudos anteriormente citados, Bastos (2004) observou que o método de CCS eletrônica por citometria de fluxo superestimou a CCS microscópica média em 4.108,99% e 2.077,06% para as amostras de leite negativas e positivas ao exame microbiológico, respectivamente. Em números absolutos, o método eletrônico acrescentou 28.311 céls/mL e 100.177 céls/mL à média das amostras de leite analisadas por método microscópico.

Malavolta (2006) não encontrou diferenças estatísticas entre a CCS eletrônica e microscópica usando o ponto de corte de 200 mil céls/mL e defende que o diagnóstico positivo para mastite subclínica em búfalas quando se usa esse limite

crítico de CCS não é afetado pelo emprego do método eletrônico e, por isso, ele também é eficaz na detecção do estado de saúde intramamária de búfalas.

Essas divergências de sub ou superestimação na contagem de células por meio do método automatizado pode aparentar um erro. Mas, Canaes (2004) e Malavolta (2006) sugerem que a diferença entre os métodos eletrônico e microscópico é basicamente devido ao critério para contabilidade celular. A contagem microscópica fornece uma estimativa da concentração de células a partir de 10 μL de leite, enquanto que a eletrônica usa uma alíquota de leite 5x mais representativa (50 μL). Microscopicamente, o analista contabiliza visualmente todos os núcleos íntegros corados, sendo de células inteiras ou lisadas. O mecanismo de ação do corante para a fluorescência adotada na citometria de fluxo depende da existência de parece celular íntegra (Bentley..., 1997), por isso são coradas somente as células inteiras, independentemente da espécie animal pela qual o leite foi sintetizado. Desta forma, é esperada uma diferença numérica entre os resultados do método padrão e do eletrônico, como sugerido por Canaes (2004) e Malavolta (2006), entretanto, o eletrônico apresenta acurácia superior ao método padrão, que é baseado na observação visual e depende da regularidade de distribuição das células na lâmina, eficiência na preparação e coloração das lâminas, e da subjetividade humana, podendo variar entre diferentes observadores ou entre observações de um mesmo observador (Evangelista, 2008; Orlandini e Bijgaart, 2011).

Acurácia, sensibilidade e especificidade são características importantes quando se avalia a eficácia de um método empregado no diagnóstico de doenças (ou outro método que se toma como referência) (Sharma et al., 2010). Essas características consideram o número de resultados Verdadeiro Positivo (VP), Verdadeiro Negativo (VN), Falso Positivo (FP) e Falso Negativo (FN) encontrados pelo método alternativo, em comparação ao método clássico (padrão-ouro ou referência) (Figura 2).

		Método referência	
Método alternativo	Positivo	Verdadeiro positivo VP	Falso positivo FP
	Negativo	Falso negativo FN	Verdadeiro negativo VN

Figura 2. Quadro para análise dos resultados do método alternativo e relação ao método clássico ou referência.

A acurácia se refere ao grau em que o método é capaz de indicar o verdadeiro resultado diagnóstico e pode ser calculada pela relação: $VP + VN / (VP + FP + FN + VN) \times 100$ (Sharma et al., 2010). A sensibilidade é a capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem para detectar os indivíduos verdadeiramente positivos (doentes) e especificidade é a capacidade que ele tem de detectar os verdadeiros negativos (sadios). A sensibilidade é obtida pela relação: $VN / VP + FN \times 100$ e a especificidade, por: $VN / FP + VN \times 100$ (Sharma et al., 2010; Araújo et al., 2012).

A CCS é adotada como preditor da infecção intramamária (Sharma et al., 2010). Os testes de triagem como o CMT e a CCS são indicativos da presença de inflamação, mas não-confirmadores da infecção (Sharma e Pandey, 2011). Os testes de triagem (método alternativo) antecedem o exame microbiológico - possibilitam a identificação de animais que apresentam inflamação, orientam a colheita de material para o exame microbiológico (que confirma a condição de saúde do animal – método padrão-ouro) e servem de base para os rápidos ajustes das práticas de manejo e higiene na ordenha, como a organização das linhas de ordenha, (Philpot e Nickerson, 1991), antes do diagnóstico definitivo da doença.

Em um estudo com 1042 amostras de leite bubalino, Pizauro (2013) constatou que 8,34% (87/1042) foram positivas para mastite subclínica pelo CMT; e 11,4% (119/1042) apresentou crescimento bacteriano, o que significa que 32 amostras eram falso-negativas pelo CMT, resultando em 78% de sensibilidade do teste CMT. Os resultados dos métodos de triagem condutividade elétrica e CMT podem não refletir adequadamente o status bacteriológico da glândula mamária, mas podem dar indícios da presença de inflamação no úbere (Sharma et al., 2010), que se manifesta durante a infecção ou por até algum tempo após cura. A literatura sugere, então, que o diagnóstico da mastite em búfalas seja baseado nos resultados de contagem direta de células somáticas do leite acompanhados prioritariamente do exame microbiológico, uma vez que nem sempre búfalas com altas contagens de células somáticas no leite apresentam exame microbiológico ou CMT positivos e vice-versa (Brito et al., 1997; Jorge et al., 2005; Kapronezai et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Pizauro, 2013). Erros de diagnóstico com animais falso-positivos ou falso-negativos são esperados, quando se trata dessa temática, tendo em vista que o resultado dos

métodos de triagem pode envolver interpretação subjetiva, dependência em sensores, calibração, temperatura dos insumos (reagente) e do leite, etc.

A quantidade e proporção de cada tipo celular (leucócitos e células de descamação epitelial) e a microbiologia presentes na glândula mamária do animal podem variar de acordo com diversos fatores como o ambiente (fatores endêmicos, clima, higiene de instalações e no manejo de ordenha) e o estado nutricional e fisiológico dos animais (idade, ordem de parto, período de lactação, sistema imune, etc.) (Harmon, 1994; Bastos e Birgel, 2011; Pizauro, 2013). Dessa forma, cada animal tende a manter um perfil microbiológico e celular próprio.

Há casos nos quais as células de defesa conseguem destruir os patógenos causadores da mastite eficientemente, de modo que o animal tenha cura espontânea e, mesmo depois de anulada a infecção, o leite apresente CCS alta até regredir progressivamente (Ruegg e Pantoja, 2013). Dessa maneira, é imprescindível que o diagnóstico definitivo da doença seja feito com base em resultados microbiológicos e de CCS, e que este último tenha sido obtido por métodos de análises acurados e confiáveis.

Os estudos sobre o diagnóstico de uma doença relacionam os resultados do método diagnóstico (padrão-ouro) com outro método alternativo. Para a mastite, o diagnóstico costuma ocorrer relacionando os resultados de exame microbiológico (padrão-ouro) com contagem direta de células somáticas (ou outros métodos de triagem); ou relacionando dois métodos de triagem, quando se deseja comparar um método direto (padrão-ouro ou referência) com um indireto, por exemplo. No estudo que relaciona dois métodos de triagem, quando um deles aponta casos falso-positivos em grande proporção, ele está indicando alta CCS no leite, quando na verdade há baixa CCS, levando o proprietário a realizar o exame microbiológico desnecessariamente, ou direcionando equivocadamente o descarte ou tratamento sem que o animal esteja doente. E quando o método aponta muitos casos falso-negativos (CCS baixa, mas o animal está com alta CCS), ele pode contribuir para que se mantenha no rebanho animais com a doença mascarada ou oculta, que atuam como reservatórios de patógenos e disseminadores da mastite.

Dessa forma, ao se avaliar a eficiência de um método de triagem para o diagnóstico confiável da mastite, deve-se levar em consideração a sua capacidade

de: a) identificar corretamente o leite com maior CCS, o que se chama de “sensibilidade do teste”; b) excluir corretamente o leite com menor CCS (especificidade do teste); e, c) indicar um menor número de resultados falsos (Santos e Fonseca, 2007).

Os sistemas de ordenha automatizados permitem a obtenção individualizada e instantânea de dados dos animais e o acompanhamento em tempo real de informações importantes para o manejo, incluindo fatores de qualidade do leite, condutividade elétrica, nível de produção, desempenho dos animais durante a ordenha (fluxo de leite, tempo em ordenha), etc. Utilizando ferramentas simples ou de tecnologia sofisticada como esta, é possível se executar um bom programa de controle da saúde de glândula mamária do rebanho a partir de práticas rotineiras de mensurações, exames e coleta de informações diretamente na fazenda, o que permite agilidade na tomada de decisões.

3. REFERÊNCIAS

- Alhussien MN, Dang AK (2018) Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World** 11(5): 562-577.
- Al-Tarazi Y, Albetar M, Alaboudi A (2009) Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International** 42: 374-379.
- Amaral FR, Carvalho LB, Brito JRF, Silva N (2005) Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 29(2):101-105.
- Andreatta E, Fernandes AM, Santos MV, Mussarelli C, Marques MC, Gigante MI, Oliveira CAF (2009) Quality of minas frescal cheese prepared from milk with different somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44(3):320-326.
- Araújo VM, Rangel AHN, Bezerra KC, Andrade KD, Guerra MG (2012) Avaliação de testes rápidos para análises da contagem de células somáticas de leite cru de tanques. **Acta Veterinaria Brasilica** 6(4):321-324.
- Bastos PAS (2004) **Constituição físico-química, celular e microbiológica do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no estado de São Paulo**. 128f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.
- Bastos PAS, Birgel, EH (2011) Leite de búfalas Murrah criadas em São Paulo (Brasil): Influência da idade, fase de lactação, momento de ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** 9(3): 6-13.

Bentley Instruments Inc (1997) Somacount 300 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.116 p.

Biggs A (2009) Mastitis in cattle. Marlborough: The Crowood Press, 192p.

Bobbo T, Ruegg PI, Stocco Fiore E, Giancesella M, Morgante M, Pasotto D, Bittante G, Cecchinato A (2017) Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 100:1–16.

Borghese A, Mazzi M (2005) Buffalo population and strategies in the world. In: Borghese A (Ed) **Buffalo production and research**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations p. 1-321.

Borghese A, Rasmussen M, Thomas CS (2007) Milking management of dairy buffalo, **Italian Journal of Animal Science** 6:39-50.

Brito, JRF, Caldeira, GAV, Verneque, RS, Paiva e Brito, MAV (1997) Sensibilidade e especificidade do *California Mastitis Test* como recurso diagnóstico da mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 17(2):49-53.

Burton JL, Erskine RJ (2003) Immunity and mastitis Some new ideas for an old disease **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** 19:1–45

Canaes, TS (2004) **Estudo comparativo entre métodos microscópico e eletrônico na contagem de células somáticas do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758)**. 132 f. Monografia (Iniciação Científica) - Unesp, Jaboticabal.

Carvalho, LB, Amaral, FR, Brito, MAV, Lange, CC, Brito, JR, Leite, RC (2007) Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59(1): 242-245.

Catozzi C, Sanchez Bonastre A, Francino O, Lecchi C, De Carlo E, Vecchio D, Martucciello A, Fraulo P, Bronzo V, Cusco A, D'Andreano S, Ceciliani F (2017) The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PLoS ONE** 12(9):1-20.

Céron-Muñoz, M, Tonhati H, Duarte J, Muñoz-Berrocal, M, Juradogámez H (2002) Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science** 85:2885-2889.

Coelho KO, Mesquita PF, Machado AJ, Lage ME, Meyer PM, Reis AP (2014) Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66(4):1260-1268.

Condas LAZ, De Buck J, Nobrega DB, Carson DA, Roy JP, Keefe GP, DeVries TJ, Middleton JR, Dufour S, Barkema HW (2017) Distribution of non-aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis **Journal of Dairy Science** 100:5613–5627.

Dhakal IP (2006) Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine** 53(2):81-86.

Elhaig MM, Selim A (2015) Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovinds from Ismailia, Egypt. **Tropical Animal Health and Production** 47: 271.

Evangelista DT (2008) **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos**. 65 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – UFMG.

Fagiolo A, Lai O. (2007) Mastitis in buffalo. **Italian Journal of Animal Science** 6(sup2): 200-206.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Statistics Division. 2019. Production /Live Animals. Number of heads by country. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E>> Acesso em 21 jun. 2019

Fosgate GT, Petzer IM, Karzis J (2013) Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the *California Mastitis Test* for mastitis in dairy cattle. **The Veterinary Journal** 196:98–102.

Haas YH, Veerkamp RF, Barkema HW, Grohn YT, Schukken YH (2004) Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. **Journal of Dairy Science** 87: 95–105.

Harmon RJ (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science** 77:2103-2112.

Hussain R, Javed MT, Khan, A (2012) Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. **Pakistan Veterinary Journal** 32(3):418-421.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa da pecuária municipal**. Efetivo dos rebanhos - 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 21 set. 2019

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). Milk. Enumeration of somatic cells. Brussels: IDF Standard 148A, 1995 8p.

ISO 13366-1|IDF 148-1 (2008) Milk-enumeration of somatic cells, Part 1-microscope method (reference method).

ISO 13366-2|IDF 148-2 (2006) Milk-enumeration of somatic cells, Part 2-guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters.

Johler S, Stephan R (2010) Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv Lebensmittel hygiene** 61:220-228.

Jorge AM, Andrighetto C, Strazza MRB, Correa RC, Kasburgo DG, Piccinin A, Victoria C, Domingues PF (2005). Correlação entre o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia** 34(6):2039-2045.

Jorgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Sølverød L, Kvitle B, Mørk T (2016) *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks? **Veterinary Microbiology** 184:64-72.

Kapronezai J, Melville P, Benites NR, 2005. 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. **Arquivo do Instituto Biológico** 72(2):183-187.

Kashyap DK, Giri DK, Dewangan G (2019) Prevalence of sub clinical mastitis (SCM) in she buffaloes at Surajpur district of Chhattishgarh, India. **Buffalo Bulletin** 38(2):373-381.

Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison: National Mastitis Council, 1999. 222 p.

Langoni H, Domingues PF, Molero Filho JR, Baldini S (2001). Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Ars Veterinaria** 17(3):213-217.

Langoni H, Penachio, DS, Nobrega DB, Guimarães FF, Lucheis SB (2012) Somatic cell as a screening method for somatic cell count from bovine milk. **Ciência Rural** 42(6):1095-1101.

Mahajan S, Bhatt P, Ramakant, Kumar A, Dabas YPS (2011) Risk and occurrence of bovine mastitis in Tarai region of Uttarakhand. **Veterinary practitioner** 12:244- 247.

Malavolta FC (2006) **Métodos indiretos de avaliação da saúde da glândula mamária nas espécies bovina e bubalina**. 68f Dissertação (mestrado) - Unesp, Jaboticabal.

Mazal G, Vianna PCB, Santos MV, Gigante ML (2007) Effect of somatic cell count on prato cheese composition. **Journal of Dairy Science** 90:630–636.

Medeiros ES, Barbosa SBP, Jatobá RB, Azevedo SS, Junior JWP, Saukas TN, Albuquerque PPF, Mota RA (2011) Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31(3):219-223.

Montanhini MTM, Moraes DHM, Neto RM (2013) Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 68(392):18-22.

Moroni P, Sgoifo Rossi C, Pisoni G, Bronzo V, Castiglioni B, Boettcher PJ (2006) Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **Journal of Dairy Science** 89:998–1003.

Moura E, Rangel AHN, Melo MC, Borba LHF, Lima Júnior DM, Novaes LP, Urbano SA, Andrade Neto JC (2017) Evaluation of microbiological, cellular and risk factors associated with subclinical mastitis in female buffaloes **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 30(9):1340-1349.

Moura E, Rangel AHN, Urbano SA, Macêdo CS, Novaes LP, Lima Júnior DM (2019) Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* from buffalo milk. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** 38(8):587-591.

Mustafa YS, Awan FN, Zaman T (2013) Prevalence and antibacterial susceptibility in mastitis in buffalo and cow in district lahore-pakistan. **Pakistan Journal of Pharmacy** 20132(4):29-33.

Norberg E (2005) Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. **Livestock Production Science** 96:129–139.

- Nyman AK, Ekman T, Emanuelson U, Gustafsson AH, Holtenius K, Waller KP, Sandgren CH (2007) Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. **Preventive Veterinary Medicine** 78:142–160.
- Oikonomou G, Machado VS, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC (2012) Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. **PLoS One** 7(10): e47671.
- Orlandini S, Bijgaart H (2011) Reference system for somatic cell counting in milk. **Accreditation and Quality Assurance** 16:415–420.
- Pantoja JC, Hulland C, Ruegg PL (2009) Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation **Journal of Dairy Science** 92:139–148.
- Pardo RB (2007) **Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite** 80 f Tese (doutorado) – UNESP, Jaboticabal.
- Pereira Neto M, Rangel AH, Araújo VM, Lima Júnior DM, Medeiros HR, Novaes LP, (2014) Avaliação de métodos rápidos para análises da contagem de células somáticas no leite cru de tanques de resfriamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 69(3):193-198.
- Philpot WN, Nickerson SC (1991) **Mastitis: counter attack**. Babson Bros Naperville. 150p.
- Pizauro L JL (2013) **Perfil bioquímico, condição microbiológica e celularidade do leite de búfalas**. 94f Dissertação (mestrado) - UNESP, Jaboticabal.
- Pizauro L JL, Silva DG, Santana AM, Clemente V, Lara GHB, Listoni FJP, Vaz ACN, Vidal-Martins AMC, Ribeiro MG, Fagliari JJ (2014) Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66(6):1703-1710.
- Purohit GN, Gaur M, Shekher C (2014) Mammary gland pathologies in the parturient buffalo. **Asian Pacific Journal of Reproduction** 3(4):322-336.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC (2005) Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007) Diseases of the mammary gland. In:_____. (Eds.). *Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. Philadelphia: Saunders 2156p.
- Rangel AHN, Oliveira JPF, Araujo VM, Bezerra KC, Medeiros HR, Lima Júnior DM, Araujo CGF (2011) Influence of the stage of lactation on the composition of milk of water buffalo. **Acta Veterinaria Brasílica** 5:306-310.
- Rhoda, DA, Pantoja JCF (2012) Using Mastitis Records and Somatic Cell Count Data **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 28:347–361.
- Rodrigues ACO, Cassoli LD Machado PF, Ruegg PL (2009) Short communication: Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. **Journal of Dairy Science** 92:990-995.

Rossi RS, Amarante AF, Correia LBN, Guerra ST, Nobrega DB, Latosinski GS, Rossi BF, Rall VLM, Pantoja JCF (2018) Diagnostic accuracy of Somaticell, *California Mastitis Test*, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science** 101:1–10.

Ruegg PL (2013). Antibiotic treatments for bovine mastitis: Who, what, when, how and why? Proceedings of the 46th Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners, Milwaukee, WI, USA.

Ruegg PL, Pantoja JCF (2013) Understanding and using somatic cell counts as an indicator of milk quality. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 52:101-117.

Salari F, Altomonte I, Martini M (2013) Il latte di bufala: studio di alcuni parametri produttivi. **Large Animal Review** 19:17-20.

Sales DC, Rangel AHN, Urbano SA, Borges KC, Andrade Neto JC, Chagas BME (2016) Cheese yield in Brazil: state of the art. **Food Science and Technology** 36(4): 563-569.

Sales DC, Rangel AHN, Urbano SA, Freitas AR, Tonhati H, Novaes LP, Pereira MIB, Borba LHF (2017) Relationship between mozzarella yield and milk composition, processing factors, and recovery of whey constituents. **Journal of Dairy Science** 100: 4308-4321.

Salvador RT, Beltran JM, Abes NS, Gutierrez CA, Mingala CN (2012) Short communication: Prevalence and risk factors of subclinical mastitis as determined by the *California Mastitis Test* in water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Nueva Ecija, Philippines. **Journal of Dairy Science** 95(3):1363-6.

Santos MV, Fonseca LFL (2007) **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Editora Manole, 1ªed.

Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC (1971). Bovine mastitis: Physical and chemical tests for detection of mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia, p.128-157.

Schalm OW, Noorlander DO (1957) Experiments and observations leading to developments and the *California Mastitis Test*. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 130(5):199-207.

Sharma N, Gupta SK, Sharma U, Hussain K (2007) Treatment of clinical mastitis in buffaloes – A case report. **Buffalo Bulletin** 26(2):5658.

Sharma N, Pandey V, (2011) Comparative evaluation of three tests used for the screening of mastitis. **Indian Journal of Animal Sciences** 81:140-142.

Sharma N, Pandey V, Sudhan NA (2010) Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine** 74:51-62.

Sharma N, Singh NK.,Bhadwal MS (2011) Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asian-Australas Journal of Animal Science** 24(3):429 – 438.

Silva NS, Silveira JÁ, Oliveira CM, Mendonça C, Albernaz TT, Guaraná EL, Lima DH, Barbosa JD (2014) Ocorrência de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas em sistema extensivo no estado do Pará, Brasil. **Bioscience Journal** 30(2):839-846.

Schukken YH, González RN, et al. (2009) CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology** 134:9-14.

Singh PJ, Singh KB (1994) A study on economic losses due to mastitis in India. **Indian Journal of Dairy Science** 47:265-72.

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

Sollecito NV, Lopes LB, Leite RC (2011) Contagem de células somáticas, perfil de sensibilidade antimicrobiana e microrganismos isolados de mastites em búfalos: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 33:18-22.

Teixeira LV, Bastianetto E, Oliveira DAA (2005) Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 29:96-100.

Thompson DI, Postle DS (1964). The Wisconsin Mastitis Test – An indirect estimation of leucocytes in milk. **Journal of Milk and Food Technology** 27:271–275.

Tonhati H, Camargo GMF, Aspilcueta-Borquis RR (2011) Programa de melhoramento genético de búfalos no Brasil: estado da arte. In: SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA, **Anais...** São Paulo, p. 1-11.

Tripaldi C, Palocci G, Catta M, Orlandini S, Amatiste S, Di Bernardini R, Catillo G (2010) Effects of mastitis on buffalo milk quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 23(10):1319-1324.

Tripaldi C, Terramoccia S, Bartocci M, Angelucci M, Danese V (2003) The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo milk. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 16:738-742.

Vianni MCE, Nader Filho A, Rosseti DJG, Longhi JL, Sicher M (1990) Eficiência do California Mastitis Test (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária** 4(2):3-4.

Voltolini TVGT, Santos MA, Zambom NP, Ribas EE, Müller JC, Damasceno LCV, Ítavo Veiga DR (2001) Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum Animal Science** 23:961-966.

CAPÍTULO 2 – Mastite subclínica em búfalas e sua relação com a contagem de células somáticas, métodos de triagem e exame microbiológico

RESUMO – O monitoramento da saúde de glândula mamária de animais na fazenda pode ser realizado sob auxílio de testes de triagem baseados nas alterações celulares e minerais do leite. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os quartos mamários com e sem infecção intramamária, e avaliar a associação entre a presença de infecção, a contagem de células somáticas e os resultados dos métodos de triagem. O estudo foi realizado em um rebanho de búfalas no estado do Rio Grande do Norte. Foram colhidas 533 amostras de leite de quartos mamários que foram submetidas à contagem eletrônica de células somáticas (CCS), aos testes de triagem (*California Mastitis Test* – CMT, teste Somaticell - SO e condutividade elétrica – CEL) e ao exame microbiológico para diagnóstico da mastite subclínica (IMM: positiva/negativa), classificação da infecção (negativa, contagiosa, ambiental, mista e oportunista) e do microrganismo envolvido (negativa, individual ou misto). Foi desenvolvida análises descritivas por distribuição de frequências, e medidas de posição, dispersão e distribuição dos dados para caracterização dos quartos mamários. Também foram realizadas análises associativas pelo modelo linear generalizado e teste de qui-quadrado para verificar a dependência e correspondência entre os métodos de triagem e a presença da infecção intramamária. A maioria dos quartos mamários avaliados tinham até 400 mil céls/mL. As reações positivas ao CMT ocorreram em 59,29% dos quartos mamários avaliados, sendo a reação 1+ a mais frequente dentre as positivas. 46,72% dos quartos mamários apresentou CCS acima de 400 mil céls/mL pelo teste SO. A CEL de 49,34% dos quartos mamários era maior que 4,5 mS/cm. As médias de CCS, SO e CEL foram 1.104,90 e 675,95 céls/mL e 4,88 ms/cm, respectivamente. A infecção intramamária foi diagnosticada em 68,73% dos quartos mamários investigados, sendo que metade (50,55%) estava infectada por apenas uma espécie de microrganismo. A maioria dos casos de IMM positiva era do tipo contagiosa (47,62%), principalmente por *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae*, seguida da ambiental (30,69%), principalmente *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterococcus* spp; e oportunista (19,58%), representada pelos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. Houve variação significativa de CCS nas classes de CMT, SO e CEL. Foi encontrada correspondência altamente significativa entre os testes CMT e Somaticell. Não existe associação entre a CCS, posição do quarto mamário, presença da infecção, tipo da infecção e do microrganismo. Há associação entre a variação da condutividade elétrica e a presença de IMM e concordância entre esta e os resultados de CMT. Os métodos de triagem realizados na fazenda auxiliam a identificação de quartos mamários com alta contagem de células somáticas. A condutividade elétrica e o CMT têm relação com a presença de infecção intramamária, mas o diagnóstico da doença deve ser confirmado pelo exame microbiológico do leite quartos mamários de búfalas.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, glândula mamária, infecção, leite

1. INTRODUÇÃO

A mastite consiste na inflamação dos tecidos mamários de fêmeas leiteiras, que é causada principalmente pela invasão de microrganismos através do orifício da teta ou lesões, mas também pode ser causada por traumas (Smith, 2002). Essa também é uma doença que acomete búfalas leiteiras em todo o mundo, havendo relatos de prevalência entre 8,81 e 68,33% em rebanhos da espécie (Vianni et al., 1990; Kapronezai et al., 2005; Salvador et al., 2012; Mustafa et al., 2013; Pizauro et al., 2014; Kashyap et al., 2019). Ela pode se apresentar de forma aguda, com sinais clínicos visíveis (mastite clínica) ou sem sinais visíveis (mastite subclínica).

A invasão da glândula mamária, ou infecção intramamária (IMM), ocorre principalmente por bactérias e provoca prejuízos na produção e qualidade do leite e derivados, aumento do custo de produção, descarte involuntário de animais, além de outros (Céron-Muñoz et al., 2002; Kapronezai et al., 2005; Medeiros et al., 2011; Purohit et al., 2014). Por isso, as fazendas adotam programas de prevenção e controle da mastite, incluindo o acompanhamento e gerenciamento de informações (Ruegg e Pantoja, 2013; Jorgensen et al., 2016). A principal ferramenta adotada nesses programas é a contagem de células somáticas (CCS) do leite, que caracterizam a resposta inflamatória no úbere, podendo indicar a presença da IMM. Os animais podem apresentar aumento da proporção de células somáticas sem estar em quadro infeccioso (Medeiros et al., 2011). Por isso, o melhor método para diagnóstico definitivo da mastite subclínica em búfalas é o exame microbiológico – que exige tempo, cuidados na obtenção das amostras e maiores custos de análise. Mas, o monitoramento dos animais na fazenda pode ser realizado sob auxílio de testes de triagem baseados nas alterações celulares do leite (Philpot e Nickerson, 1991; Sharma e Pandey, 2011). Os métodos de triagem mais conhecidos são a contagem direta de células somáticas (manual ou eletrônica) e testes indiretos baseados em viscosidade, como o *California Mastitis Test* e o teste Somaticell, e, ainda, o método de condutividade elétrica. Ainda não existe uma concordância sobre o limite crítico de CCS e do método de triagem que indica corretamente a presença de mastite subclínica em búfalas.

Os principais microrganismos que provocam mastite nos animais leiteiros são as bactérias, mas as leveduras, fungos e até algas também podem estar envolvidas na infecção (Moroni et al., 2006; Purohit et al., 2014). A incidência, prevalência e etiologia da mastite subclínica pode ser influenciada por diferenças regionais, sazonais e climáticas que estão relacionadas principalmente às condições ideais de proliferação bacteriana (Nyman et al., 2007).

No sentido de se conhecer melhor sobre a mastite subclínica em búfalas, este estudo teve como objetivo caracterizar os quartos mamários com e sem infecção intramamária; e avaliar a associação entre a presença de infecção intramamária, a contagem de células somáticas e os resultados dos métodos de triagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal/SP (Protocolo Nº 08551/17).

2.1 Local de estudo e animais

O estudo foi conduzido em um rebanho comercial de búfalas localizado na cidade de Taipu, região Agreste do estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2018 a março de 2019. O clima é caracterizado como AS com duas estações - chuvosa (fevereiro a julho) e seca (agosto a janeiro), segundo classificação Köppen.

O rebanho era constituído por aproximadamente 500 fêmeas da raça Murrah e mestiças, mantidas em pastejo rotacionado (*Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* cv. Massai) na época chuvosa. Na época seca, a dieta dos animais era composta por cana-de-açúcar (*Saccharum ofcinarum*) com 1% de uréia + sulfato de amônio (9:1), palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), folha de pornunça (*Manihot* spp.), e suplementação com farelo de milho e soja. As búfalas recebiam concentrado durante a ordenha, na proporção de 1kg para cada 3kg de leite produzido.

Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia (3h e 15h) em sistema rotatório (carrossel) com capacidade para ordenhar 40 búfalas simultaneamente, a cada rotação completa. A ordenha acontecia de acordo com a seguinte rotina (APÊNDICE, Figura 1): 1. Na sala de espera, os animais recebiam

aspersão de água de baixo para cima, direcionados para o úbere, para fins de limpeza; 2. Depois, eram liberados por um portão automático para acessar a cabine individual, com a plataforma em movimento de rotação; 3. Imediatamente depois de sua entrada à cabine, eram realizados os procedimentos pré-ordenha que consistiam na desinfecção dos tetos com solução pré-dipping, secagem com papel toalha e descarte de três jatos de leite; 4. Colocação do conjunto de ordenha; 5. Aplicação de iodo glicerinado 10% nos tetos ao fim da ordenha; e, 5. Saída da plataforma.

2.2 Colheita das amostras de leite

A colheita de amostras de leite ocorreu na ordenha da manhã. Foram obtidas 533 amostras de leite de quartos mamários de búfalas sem mastite clínica, selecionadas aleatoriamente e que aceitavam a ordenha manual.

Após o procedimento de pré-ordenha, realizou-se a desinfecção do teto com algodão embebido em álcool etílico 70% e colheita de forma asséptica de uma amostra (15 mL) de leite em tubo estéril e, em seguida, uma amostra de 150 mL. A primeira amostra foi congelada e destinada ao exame microbiológico. A segunda amostra foi subdividida em alíquotas para a contagem eletrônica de células somáticas (40 mL), condutividade elétrica (40 mL), Somaticell (2 mL) e *California Mastitis Test* (2 mL). A alíquota destinada à contagem eletrônica de células somáticas continha pastilha de conservante 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol e foi enviada para análise em temperatura ambiente. As demais amostras foram mantidas por até 24h sob refrigeração, até o momento da análise.

2.3 Análises do leite

A cultura bacteriológica foi realizada em 275 amostras, de acordo com técnicas e procedimentos padrões do National Mastitis Council (Laboratory... 1999). Foram semeadas assepticamente alíquotas de 0,01mL de leite em placas de petri contendo ágar com sangue de carneiro a 5% e agar MacConkey, foram incubadas à 37°C por 24 horas e depois se procedeu a avaliação das características morfológicas das colônias isoladas. Inócuos individuais foram semeados em meios seletivos e diferenciais (ágar infusão de cérebro e coração - BHI acrescido de cloreto de sódio; bilisculina; ágar D'manitol; meio de cultura Rúgai & Pessoa) para observação dos

aspectos fenotípicos de morfologia e coloração característicos dos gêneros (Quinn et al., 2011). Os microrganismos foram diferenciados por meio de provas bioquímicas (Harmon et al., 1990). As amostras de leite dos quartos mamários foram definidas como positivas para infecção intramamária quando foi isolada pelo menos uma colônia de *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus agalactiae*; ou isolamento de 1 a 3 colônias de outros microrganismos. Os cultivos com mais de 3 colônias foram considerados como contaminados. Das 533 amostras destinadas ao exame microbiológico, 255 estavam inviáveis para análise e outras 3 amostras tiveram resultado “contaminado”, por isso, foram consideradas 275 amostras para o estudo com as variáveis microbiológicas.

A contagem eletrônica de células somáticas (CCS) foi realizada por citometria de fluxo (ISO 13366-2|IDF 148-2), no equipamento Somacount 300 (Bentley Instruments Incorporated, Minnesota, EUA), calibrado para leite bovino.

O *California Mastitis Testis* (CMT) foi realizado por um único analista e a reação do leite ao teste foi interpretada como negativa, traços, 1+, 2+ e 3+, conforme sugerido por Schalm e Noorlander (1957).

O teste Somaticell (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) foi realizado segundo recomendações do fabricante. O teste foi realizado por pessoas treinadas e os tempos foram cronometrados.

A leitura da condutividade elétrica do leite (CEL) de cada quarto mamário dos animais foi obtida por meio de condutímetro digital (Quimis) devidamente calibrado, com faixa de medição entre 0 e 20 miliSiemens por centímetro (mS/cm). Para tanto, foi submergido na amostra um eletrodo capaz de captar a corrente elétrica oriunda da troca entre cátions e ânions do leite, apresentada automaticamente no visor digital do equipamento.

O CMT, CEL e Somaticell foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LABOLEITE/UFRN, Macaíba, Brasil) (APÊNDICE, Figura 2). A contagem de células somáticas por método eletrônico e a análise microbiológica foram realizadas em laboratórios comerciais, respectivamente, Laboratório Clínica do Leite, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP, Piracicaba/SP, Brasil) e Tecsa Laboratórios (Belo Horizonte/MG, Brasil).

2.4 Análise estatística

As variáveis consideradas nesse estudo se dividem em: I) Características microbiológicas – Condição da infecção intramamária (IMM: 1-ausente, 2-presente); Tipo da infecção (TINF: 1-negativa, 2-contagiosa, 3-ambiental, 4-contagiosa + ambiental, 5-oportunista); tipo de isolamento dos microrganismos (ISOL: 1-negativo, 2-individual, 3-misto); II) Testes de triagem - Contagem eletrônica de células somáticas (CCS: mil céls/mL); *California Mastitis Test* (CMT: negativo, Traço, 1+, 2+ e 3+); Teste Somaticell (SO: <200, 200-400, >400 céls/mL); e Condutividade elétrica (CEL: mS/cm); III) Posição do quarto mamário (QM: 1-anterior, 2-posterior).

As análises descritivas dos dados foram obtidas para a caracterização dos quartos mamários de búfalas, de acordo com os resultados dos testes de triagem, posição dos tetos e exame microbiológico.

As classes das variáveis CCS, CMT, SO, QM, IMM, ISOL, TINF foram avaliadas pela distribuição de frequências: Frequência absoluta (f_i) (número total de elementos em cada classe), Frequência acumulada (somatório da frequência para cada categoria), Frequência relativa (fr_i) (razão entre cada valor da frequência absoluta (f_i) e o total de observações ($\sum f_i$): $fr_i = \frac{f_i}{\sum f_i}$), Frequência relativa percentual ($fr_i, \%$) (frequência relativa (fr_i) dada em porcentagem: $fr_i(\%) = fr_i \times 100$), e Frequência relativa acumulada (somatório da frequência relativa).

A análise das variáveis numéricas (CCS, CEL e SO) foi realizada pelas medidas de posição (média, mediana, moda e quartis), dispersão (amplitude, e coeficiente de variação) e distribuição dos dados (assimetria/distorção e curtose). Espera-se que os valores da média, mediana e moda de cada variável coincidam, apresentando a curva de distribuição normal, em forma de sino, com coeficiente de assimetria próximo de zero. A curtose é uma medida do grau de achatamento de uma distribuição em relação à curva normal, que tem valor de curtose igual ou próximo de zero.

Os resultados do teste Somaticell e condutividade elétrica foram agrupados em classes, para as análises associativas. Foram consideradas as classes <200 mil céls/mL (classe 1), entre 200 e 400 mil céls/mL (classe 2) e > 400 mil céls/mL (classe 3), para o Somaticell. Já os valores de condutividade foram distribuídos em 7 classes:

menor ou igual a 3,50; entre 3,50 e 4,00; entre 4,00 e 4,50; entre 4,50 e 5,00; entre 5,00 e 5,50; entre 5,50 e 6,00; e maior que 6,00 mS/cm.

A variação da CCS de acordo com os escores de CMT e as classes de SO e CEL foi avaliada pela função de modelo linear generalizado (GLM), sendo considerada a família Poisson e a função de ligação log, tendo em vista que os dados não têm distribuição normal.

Para verificar a correspondência entre os testes de triagem (CMT, Somaticell e condutividade elétrica), a CCS e a presença da IMM foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2), considerando os escores de CMT, as três classes de Somaticell e as sete classes de condutividade elétrica. O teste também foi aplicado para verificar a correspondência entre os testes CMT e Somaticell, que são igualmente baseados em reação de viscosidade. Foi considerado o nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando a linguagem computacional do R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos quartos mamários de búfalas de acordo com os resultados dos testes de triagem, posição dos tetos e exame microbiológico

A distribuição de frequências e os histogramas das variáveis categóricas encontram-se na Tabela 1 e na Figura 1, respectivamente.

Pouco mais da metade (53,28%) dos quartos mamários avaliados tinham até 400 mil céls/mL na contagem eletrônica, e a maioria destes apresentou menos de 100 mil céls/mL. Em contrapartida, nos 46,72% com CCS maior que 400 mil céls/mL, a maioria estava na mais alta classe de CCS, correspondente aos valores acima de um milhão, elevando o valor médio desta variável, descrito na Tabela 2.

Por meio do teste Somaticell também foram classificados 46,72% de quartos mamários com CCS acima de 400 mil céls/mL (Tabela 1), mesma proporção identificada pela contagem eletrônica, indicando que o teste Somaticell tem correspondência com a contagem de células somáticas para a triagem de búfalas.

Tabela 1. Distribuição (%) de frequências das amostras de leite de búfalas (n=533) em relação às classes de contagem eletrônica de células somáticas (CCS), teste Somaticell, *California Mastitis Test* e condutividade elétrica.

Classe	f_i^1	f_i acumulada	fr_i^2	fr_i acumulada
<i>Contagem eletrônica de Células Somáticas</i> (x mil céls/mL)				
--- 100	126	126	23,64	23,64
101--- 200	69	195	12,95	36,59
200--- 400	89	284	16,70	53,28
400--- 600	43	327	8,07	61,35
600--- 800	40	367	7,50	68,86
800--- 1000	24	391	4,50	73,36
--- 1001	142	533	26,64	100,00
<i>Somaticell</i> (x mil céls/mL)				
--- 200	163	163	30,58	30,58
200 --- 400	86	249	16,14	46,72
--- 400	284	533	53,28	100,00
<i>California Mastitis Test</i>				
Negativo	143	143	26,83	26,83
Traços	74	217	13,88	40,71
1+	133	350	24,95	65,67
2+	92	442	17,26	82,93
3+	91	533	17,07	100,00
<i>Condutividade Elétrica</i> (mS/cm)				
--- 3,50	37	37	6,94	6,94
3,50 --- 4,00	122	159	22,89	29,83
4,00 --- 4,50	111	270	20,83	50,66
4,50 --- 5,00	83	353	15,57	66,23
5,00 --- 5,50	53	406	9,94	76,17
5,50 --- 6,00	41	447	7,69	83,86
6,00 ---	86	533	16,14	100,00

¹ f_i : Frequência absoluta das amostras; ² fr_i : frequência relativa.

As reações positivas ao CMT ocorreram em 59,28% dos quartos mamários avaliados, sendo a reação 1+ a que teve maior frequência, dentre as positivas. A condutividade elétrica do leite de 49,34% dos quartos mamários era maior que 4,5 mS/cm, sendo que a maioria destes (16,14%) estava na classe acima de 6,0 mS/cm (Tabela 1 e Figura 1).

A análise das medidas de posição (média, mediana, moda e quartis), dispersão (amplitude e coeficiente de variação) e distribuição dos dados das variáveis numéricas CCS, SO e CEL encontra-se na Tabela 2. Considerando-se conjuntamente as informações de similaridade entre as medidas de tendência central, comparação dos coeficientes de assimetria e de curtose com o valor zero, dispersão dos dados em

relação à média, a CEL foi a variável mais próxima da normal, seguida da SO. A CCS não possui distribuição normal.

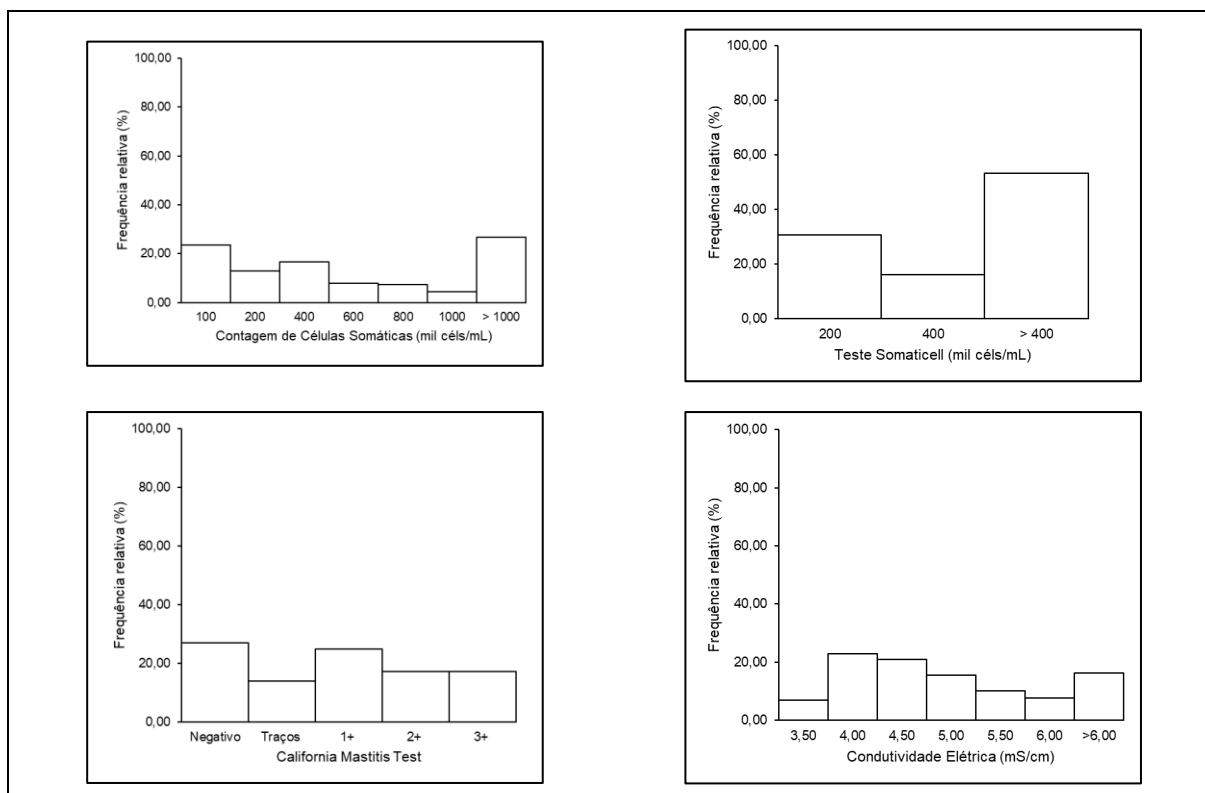


Figura 1. Histogramas da contagem eletrônica de células somáticas, teste Somaticell, *California Mastitis Test* e condutividade elétrica.

Tabela 2. Medidas de posição, dispersão e distribuição da contagem eletrônica de células somáticas (CCS, em mil céls/mL), teste Somaticell (SO, em mil céls/mL) e condutividade elétrica (CEL, em ms/cm) de amostras de leite de búfalas (n=533).

	Média	Mín ¹	Q1 ²	Med ³	Q3 ⁴	Máx ⁵	Moda	CV ⁶	Ass ⁷	Cur ⁸
CCS	1.104,90	6,00	114,00	362,00	1.133,00	9.999,00	23,00	172,07	2,86	8,28
SO	675,95	69,00	137,00	457,00	960,00	1.980,00	1.970,00	95,24	1,00	-0,40
CEL	4,88	2,89	3,93	4,48	5,40	10,30	3,98	27,84	1,37	2,43

¹Valor mínimo; ²Quartil inferior (valor limite dos 25% menores números); ³Mediana; ⁴Quartil superior (valor limite dos 25% maiores números); ⁵Valor máximo; ⁶coeficiente de variação (%); ⁷assimetria; e ⁸curtose.

A contagem eletrônica de células somáticas variou de 6 a 9999,00 mil céls/mL (limites mínimo e máximos admitidos pelo equipamento), apresentando a maior amplitude, coeficiente de variação, distorção e curtose, em relação ao SO e CEL. A condutividade elétrica variou de 2,89 a 10,30, valores próximos aos encontrados no leite de búfalas por Bastos e Birgel (2011), Hussain et al. (2012) e Moura et al. (2017).

A distribuição de frequências e histogramas das variáveis posição do quarto mamário e exame microbiológico encontram-se na Tabela 3 e na Figura 2, respectivamente.

Tabela 3. Distribuição (%) de frequências das amostras de leite de búfalas (n=275) em relação à posição do quarto mamário e exame microbiológico.

Categoria	f_i^1	f_i acumulada	fr_i^2	fr_i acumulada
<i>Quarto Mamário</i>				
Anterior	106	106	38,55	38,55
Posterior	169	275	61,45	100,00
<i>Infecção Intramamária</i>				
Negativa	86	86	31,27	31,27
Positiva	189	275	68,73	100,00
<i>Tipo de isolado</i>				
Negativa	86	86	31,27	31,27
Individual	139	225	50,55	81,82
Misto	50	275	18,18	100,00
<i>Tipo da infecção</i>				
Negativa	86	86	31,27	31,27
Contagiosa	90	176	32,73	64,00
Ambiental	58	234	21,09	85,09
Oportunista	37	271	13,45	98,55
Mista	4	275	1,45	100,00

1f_i : Frequência absoluta das amostras; 2fr_i : frequência relativa.

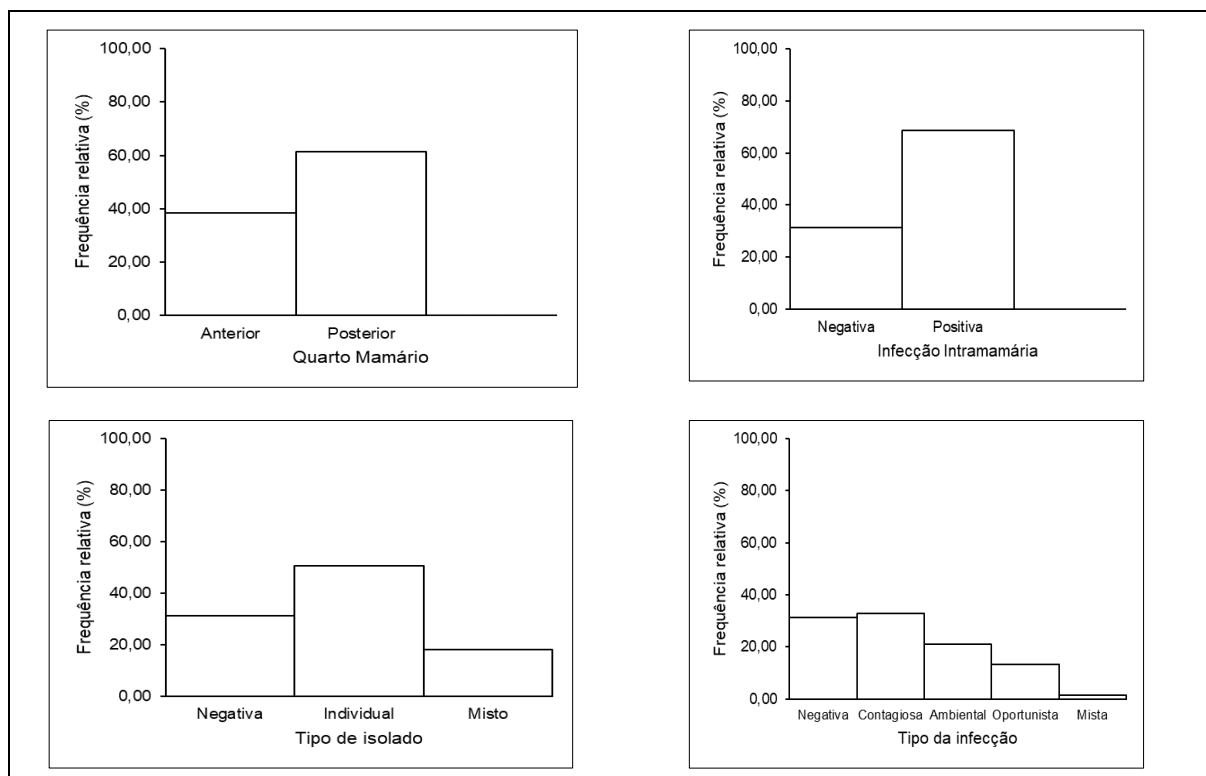


Figura 2. Histogramas da posição do quarto mamário, condição da infecção intramamária, tipo de isolado e da infecção (n=275).

A maioria das amostras (61,45%) foi obtida a partir dos quartos mamários posteriores (Tabela 3). Durante a aleatorização na obtenção das amostras, muitos animais ofereciam resistência à ordenha manual e alguns dos que toleravam a retirada de leite manualmente não possuíam fluxo adequado para a amostragem. Então, foi assegurada a obtenção de amostras somente a partir dos quartos mamários que permitiam a retirada de leite em condição de volume e higiene adequadas. O número de amostras por quarto mamário foi de 88, 81, 69 e 37 para a posição posterior esquerda, posterior direita, anterior esquerda e anterior direita, respectivamente.

A infecção intramamária foi diagnosticada em 68,73% (189/275) dos quartos mamários investigados, sendo que metade (50,55%) estava infectada por apenas uma espécie de microrganismo (isolado individual), e que a maioria das espécies era do tipo contagiosa (32,73%), seguida da ambiental (21,09%) (Tabela 3).

A comparação dos tipos de patógenos isolados a partir das amostras de leite obtidas de quartos mamários com infecção intramamária (189/275) encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Número e proporção do microrganismo de acordo com o tipo da infecção (contagiosa, ambiental, mista ou oportunista) identificada nas amostras de leite de búfalas positivas no exame microbiológico (n=189).

Tipo da infecção	Número	% do grupo	% do total de infecções
Contagiosa (+ oportunista)	90	100,00	47,62
Individual	61	67,78	32,28
Mista	29	32,22	15,34
Ambiental (+ oportunista)	58	100,00	30,69
Individual	41	70,69	21,69
Mista	17	29,31	8,99
Oportunista	37	100,00	19,58
Contagiosa + Ambiental	4	100,00	2,12

Os microrganismos contagiosos estavam presentes em 47,62% das infecções, sendo 32,28% individualmente, 15,34% combinados com outros contagiosos e 2,12% combinados com microrganismos ambientais (Tabelas 4 e 5).

A Tabela 5 relaciona a frequência (%) em que cada espécie de microrganismo se apresentou nas amostras. *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae* foram os principais representantes do grupo de microrganismos contagiosos isolados nas amostras, o que também foi visto por Pizauro et al. (2014) e Moura et al. (2017) no leite bubalino.

Tabela 5. Número e proporção do microrganismo de acordo com o tipo do isolamento (individual ou misto) identificado nas amostras de leite de búfalas positivas no exame microbiológico (n=189)

Microrganismo Isolado		n	% do grupo	% do total
Individual		139		
<i>Corynebacterium bovis</i>		39	28,06	14,18
SCN		37	26,62	13,45
<i>Streptococcus agalactiae</i>		18	12,95	6,55
<i>Acinetobacter</i> spp.		12	8,63	4,36
<i>Streptococcus</i> spp.		11	7,91	4,00
<i>Bacillus</i> spp.		8	5,76	2,91
<i>Escherichia coli</i>		3	2,16	1,09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		3	2,16	1,09
<i>Staphylococcus aureus</i>		2	1,44	0,73
<i>Strep. dysgalactiae</i>		2	1,44	0,73
<i>Levedura</i>		2	1,44	0,73
<i>Enterococcus</i> spp.		1	0,72	0,36
<i>Micrococcus</i> spp.		1	0,72	0,36
Misto		50		
<i>Corynebacterium bovis</i>	SCN	9	18,00	3,27
<i>Strep. agalactiae</i>	SCN	8	16,00	2,91
<i>Strep. dysgalactiae</i>	SCN	4	8,00	1,45
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	3	6,00	1,09
<i>Streptococcus</i> spp.	SCN	3	6,00	1,09
<i>Klebsiella</i> spp.	SCN	2	4,00	0,73
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp	2	4,00	0,73
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Escherichia coli</i>	2	4,00	0,73
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	1	2,00	0,36
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Klebsiella</i> spp	1	2,00	0,36
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	1	2,00	0,36
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i>	1	2,00	0,36
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SCN	1	2,00	0,36
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SCN	1	2,00	0,36
<i>Klebsiella</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp.	1	2,00	0,36
<i>Micrococcus</i> spp	<i>Strep. dysgalactiae</i>	1	2,00	0,36
<i>Klebsiella</i> spp	SCN	1	2,00	0,36
<i>Pseudomonas</i> spp	SCN	1	2,00	0,36
<i>Bacillus</i> spp	SCN	1	2,00	0,36
<i>Enterococcus</i> spp	SCN	1	2,00	0,36
<i>Aerococcus viridans</i>	SCN	1	2,00	0,36
<i>Klebsiella</i> spp	<i>Escherichia coli</i>	1	2,00	0,36
<i>Micrococcus</i> spp	<i>Bacillus</i> spp	1	2,00	0,36
<i>Bacillus</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp.	1	2,00	0,36
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	1	2,00	0,36

SCN: *Staphylococcus* spp.coagulase negativo

O gênero *Corynebacterium* sp. foi o mais isolado individualmente (39/139) e associado com outro microrganismo contagioso, ambiental e oportunista (16/50). Ele está relacionado a mastite subclínica leve, sem alterações evidentes na produção e qualidade do leite (Pantoja et al., 2009; Catozzi et al., 2017).

Streptococcus agalactiae esteve presente em 12,95% das amostras como isolado individual (18/139) e 30% em associação com microrganismos oportunistas,

ambientais e contagiosos (15/50). Esse patógeno é o mais prevalente nas mastites contagiosas presentes em regiões leiteiras mundiais e provocam aumentos significativos na CCS, perdas consideráveis de produção de leite e sua cura depende de antibioticoterapia prolongada (Fagiolo e Lai, 2007; Rossi et al., 2018). O controle sobre os microrganismos contagiosos também é importante porque eles são estritos do úbere e se multiplicam no rebanho durante os procedimentos de ordenha (Fagiolo e Lai, 2007).

No grupo das infecções individuais, os principais microrganismos isolados foram os *Corynebacterium bovis* (39/139), *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN) (37/139), e *Streptococcus agalactiae* (18/139). SNC também estiveram presentes na maioria das infecções mistas, associados com *Corynebacterium bovis* (9/50), *Streptococcus agalactiae* (8/50) e *Streptococcus dysgalactiae* (4/50).

O presente estudo corrobora os dados descritos por Dhakal (2006), Medeiros et al. (2011), Bastos e Birgel (2011) e Pizauro et al. (2014), que ressaltaram a prevalência do gênero estafilococos na etiologia da mastite bubalina. Silva et al. (2014) encontraram maior percentual de isolados de SCN nas amostras de leite de búfalas não reagentes ao CMT e sugeriu que isso pode estar relacionado à sua presença na microbiota normal da pele e mucosa, assim como na colonização do esfíncter e canal do teto das búfalas. De acordo com Radostits et al. (2009), apesar desse agente estar associado a infecções intramamárias crônicas, geralmente provoca inflamações de baixa intensidade e, por competição, pode dificultar a infecção por outros agentes mais patogênicos, atuando como protetor da glândula mamária.

Staphylococcus aureus foi detectado pelo exame microbiológico em poucos quartos mamários (4/189). Esse é o patógeno de maior relevância para os programas de controle da mastite, tendo em vista a sua capacidade infiltração nas porções mais profundas da glândula mamária, formação de biofilmes que dificultam a ação dos antimicrobianos e reduzem a taxa de cura, além de ser produtor de toxinas associadas à intoxicação alimentar no homem (Al-Tarazi et al., 2009; Johler e Stephan, 2010; Moura et al., 2019). *S. aureus* assemelham-se aos também identificados *Streptococcus dysgalactiae* (ambientais) quanto ao potencial invasivo no tecido intramamário, persistência e cronicidade da infecção, e têm um tratamento mais dificultoso, demorado e oneroso (Burton e Erskine, 2003). Portanto, apesar do baixo

número de amostras positivas para *S. aureus* e *Strep. dysgalactiae*, essa constatação deve ser considerada no sentido da atenção para seu controle neste rebanho.

Além de *Strep. dysgalactiae*, os principais microrganismos ambientais encontrados nesse estudo foram *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterococcus* spp. As infecções por microrganismos ambientais são conhecidas por provocar aumento acentuado da CCS, mas a taxa de cura espontânea é maior em relação à mastite contagiosa (Haas et al., 2004; Dhakal, 2006). Também foram identificados leveduras e microrganismos dos gêneros *Aerococcus*, *Acinetobacter* e *Micrococcus*, que são pouco relatados em casos de mastite subclínica em búfalas (Catozzi et al, 2017).

3.2 Associação entre a contagem de células somáticas, os resultados dos testes de triagem e a presença da infecção intramamária em búfalas

O modelo linear generalizado foi significativo ($p < 0,001$) para explicar a variação de CCS nos escores de CMT e nas classes de SO e CEL (Tabela 6), demonstrando que há dependência entre os resultados dos testes de triagem CMT, Somaticell e CEL e a proporção de células somáticas no leite de quartos mamários de búfalas.

Tabela 6. Associação da contagem eletrônica de células somáticas do leite (CCS) de acordo com as classes do teste Somaticell, California Mastitis Test e condutividade elétrica nas amostras de leite de búfalas (n=533).

Variável	n	CCS (x mil céls/mL)		
		Média	Mediana	p-valor
<i>Somaticell</i>				
--- 200	163	110,68	51,00	<0.0001
200 --- 400	117	301,15	205,50	
--- 400	284	1918,92	921,50	
<i>California Mastitis Test</i>				
Negativo	143	86,32	52,00	<0.0001
Traços	74	270,32	197,00	
1+	133	550,74	426,00	
2+	92	1244,98	930,50	
3+	91	4052,51	3089,00	
<i>Condutividade Elétrica</i>				
--- 3,50	37	121,08	26,00	<0.0001
3,50 --- 4,00	122	239,70	112,00	
4,00 --- 4,50	111	399,81	217,00	
4,50 --- 5,00	83	788,33	473,00	
5,00 --- 5,50	53	1036,02	525,00	
5,50 --- 6,00	41	1763,95	1042,00	
--- 6,00	86	3699,38	2478,50	

De fato, as reações de viscosidade identificadas pelo CMT e Somaticell são diretamente relacionadas à concentração de células somáticas no leite (Schalm e Noorlander, 1957; Rodrigues et al., 2009).

A condutividade elétrica do leite tem relação direta com a quantidade de substâncias minerais e relação inversa com a gordura (Norberg, 2005). As alterações do conteúdo eletrolítico são mais evidentes quando há prejuízo à permeabilidade capilar junto a alvéolos danificados (Kaşıkçı et al., 2012). As alterações da CCS estão associadas à presença de processo inflamatório da glândula mamária. A taxa de lipólise é proporcional ao aumento da contagem de células somáticas pela ação de suas enzimas (Montanhini et al., 2013), isso reduz a resistência do ions à gordura e aumenta a condutividade elétrica do leite.

O valor médio de CCS aumentou com o avanço das classes de Somaticell, CMT e condutividade elétrica. Foi verificada significância de todos os contrastes entre as classes de Somaticell, CMT e CEL, indicando que estas são diferentes entre si ($p < 0,05$) e confirmando que esses métodos de triagem realizados na fazenda auxiliam a identificação dos animais com maior CCS. Diante disso, as classes de valores do Somaticell e da condutividade elétrica e os escores de CMT com seus respectivos valores médios de CCS podem ser adotados como referência para a avaliação de saúde de glândula mamária de búfalas.

A condutividade elétrica depende da composição físico-química e conteúdo mineral do leite (Norberg, 2005), mesmo para animais saudáveis. A gordura oferece resistência à condutibilidade. Então, as alterações na composição lipídica do leite devido a alimentação dos animais e a ação lipolítica das células somáticas em quartos mamários com alta CCS, alteram a CEL. Desta maneira, a CEL captada pelos sensores podem variar em cada rebanho.

Foi encontrada correspondência altamente significativa ($p < 0,0001$) entre os testes CMT e Somaticell, que são igualmente baseados em reação de viscosidade (Tabela 7). Desta maneira, ambos os métodos podem ser usados pelo consultor técnico ou o produtor de leite para avaliação de quarto mamários de búfalas.

Tabela 7. Correspondência entre o teste Somaticell e o California Mastitis Test nas amostras de leite de búfalas (n=533).

<i>Somaticell</i>	<i>California Mastitis Test</i>					Total
	Negativo	Traço	1+	2+	3+	
< 200	114	29	16	3	1	163
200 - 400	23	27	26	10	0	86
> 400	6	18	91	79	90	284
Total	143	74	133	92	91	533*

*p-valor<0,0001 é significativo pelo qui-quadrado

O modelo linear generalizado não foi significativo ($p>0,05$) para explicar a variação de CCS de acordo com a posição do quarto mamário, presença da infecção, tipo de isolado (individual ou misto) e de microrganismo (contagioso, ambiental ou oportunista) (Tabela 8), demonstrando que há independência entre essas características e a proporção de células somáticas no leite de quartos mamários de búfalas. Entretanto, houve diferença numérica perceptível na CCS média entre as infecções por microrganismos oportunistas e ambientais, sugerindo que os últimos provocam uma reação inflamatória mais acentuada, o que está de acordo com o observado por Haas et al. (2004) e Dhakal (2006).

Tabela 8. Associação da contagem eletrônica de células somáticas do leite (CCS) de acordo com a posição do quarto mamário e exame microbiológico (n=275).

Variável	n	CCS (x mil céls/mL)		
		Média	Mediana	p-valor
<i>Quarto Mamário</i>				
Anterior	106	938,24	277,00	0.833
Posterior	169	1069,01	335,00	
<i>Infecção Intramamária</i>				
Negativo	86	899,12	299,00	0.292
Positivo	189	1072,97	324,00	
<i>Tipo de isolado</i>				
Negativo	86	899,12	299,00	0.567
Individual	139	1026,32	339,00	
Misto	50	1202,64	266,00	
<i>Tipo da infecção</i>				
Negativa	86	899,12	299,00	0.519
Contagiosa	90	956,91	302,00	
Ambiental	58	1253,91	260,50	
Mista	4	1159,70	131,00	
Oportunista	37	258,25	466,00	

*p<0,05 é significativo pelo modelo linear generalizado

O modelo linear generalizado não foi significativo ($p > 0,05$) para explicar a variação da CCS e do Somaticell em relação à presença da infecção, entretanto foi encontrado efeito significativo ($p < 0,05$) para a variação da condutividade elétrica (Tabela 9).

Tabela 9. Associação entre a contagem de células somáticas Somaticell e condutividade elétrica das amostras de leite de búfalas com infecção intramamária (IMM) negativa e positiva (n=275).

Variável	IMM Negativa (n = 86)		IMM Positiva (n = 189)		p-valor*
	Média	Mediana	Média	Mediana	
Contagem de células somáticas (x mil céls/mL)	992,24	244,00	1030,59	335,00	0,292
Somaticell (x mil céls/mL)	747,69	520,00	588,41	379,00	0,585
Condutividade elétrica (mS/cm)	4,48	4,10	4,80	4,48	0,038

* $p < 0,05$ é significativo pelo modelo linear generalizado

Muitos quartos mamários com CCS alta tinham IMM negativa, o que contribuiu para a elevação da média de CCS e sua não correspondência com IMM ($p = 0,292$).

Os resultados do teste qui-quadrado que verificou a correspondência entre os métodos de triagem e a presença da IMM estão na Tabela 10. O efeito dessa alta proporção de quartos mamários com CCS alta no grupo de IMM negativa (Tabela 9) também foi percebido pelo CMT (Tabela 10), que teve maior percentual de amostras classificadas como 1+ e 3+ e associação significativa pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$).

Pela classificação do Somaticell, aproximadamente 59% dos quartos mamários com CCS maior que 400 mil céls/mL seriam selecionados para diagnóstico microbiológico, mas não apresentariam IMM positiva (Tabela 10). O teste seria ineficiente descartando o tratamento para 34,92% dos quartos mamários com CCS menor que 200 mil céls/mL, mas que apresentavam IMM. O CMT também conduziria o avaliador ao erro de triagem em 31,22% das amostras interpretadas como negativas para mastite subclínica, mas que apresentavam IMM.

Como é o exame microbiológico quem confirma a presença da doença em búfala (Medeiros et al., 2011; Sharma e Pandey, 2011), os resultados sugerem que sejam adotadas as classes mais baixas dos testes de triagem para ampliar a seleção de um maior número de quartos mamários para o exame diagnóstico (microbiológico),

havendo maior eficiência no programa de controle da doença que adota os métodos de triagem indiretos na fazenda.

Tabela 10. Correspondência entre a presença da infecção intramamária (IMM) e a proporção dos resultados nas classes de Somaticell, *California Mastitis Test* e condutividade elétrica das amostras de leite de búfalas com infecção intramamária (IMM) negativa e positiva (n=275).

Teste de triagem	IMM Negativa (n = 86)	IMM Positiva (n =189)	p-valor*
	n (%)	n (%)	
<i>Somaticell</i>			
< 200	19 (22,09)	66 (34,92)	0.097
200 - 400	16 (18,60)	32 (16,93)	
> 400	51 (59,30)	91 (48,15)	
<i>California Mastitis Test</i>			
Negativo	19 (22,09)	59 (31,22)	0.012
Traços	18 (20,93)	16 (8,47)	
1+	24 (27,91)	51 (26,98)	
2+	8 (9,30)	34 (17,99)	
3+	17 (19,77)	29 (15,34)	
<i>Condutividade Elétrica</i>			
--- 3,50	7 (8,14)	9 (4,76)	0.640
3,50 --- 4,00	26 (30,23)	54 (28,57)	
4,00 --- 4,50	16 (18,60)	40 (21,16)	
4,50 --- 5,00	15 (17,44)	24 (12,70)	
5,00 --- 5,50	7 (8,14)	21 (11,11)	
5,50 --- 6,00	8 (9,30)	16 (8,47)	
--- 6,00	7 (8,14)	25 (13,23)	

*p<0,05 é significativo pelo teste do qui-quadrado (X^2)

Na prática, espera-se que o teste de triagem realizado na fazenda garanta a identificação de animais com CCS alta, como foi comprovado na Tabela 6. Mas não é obrigatório que esses testes apresentem alta correspondência com os casos positivos de IMM, porque eles são baseados em respostas inflamatórias (aumento de CCS) ou em alterações de permeabilidade capilar e/ou desbalanço de íons (aumento de condutividade) e não se relacionam diretamente com o conteúdo microbiológico. Apesar disso, foi constatada uma correspondência significativa entre o CMT e a presença da infecção (p<0,05). A divisão de classes, conforme sugerido pelo protocolo do fabricante do teste Somaticell, pode ter contribuído para que o teste não apresentasse relação significativa com a presença da infecção, como ocorreu no CMT, que tem os resultados melhor distribuídos em classes.

A independência das classes de CEL de acordo com a presença da infecção (p>0,05) demonstrada na Tabela 10 pode ser explicada pelo perfil microbiológico

identificado nas amostras de leite dos quartos mamários com IMM. As alterações da condutividade elétrica têm relação com o tipo de microrganismo envolvido na infecção – os prejuízos aos tecidos secretores e vasos sanguíneos são maiores, quanto maior é a patogenicidade e capacidade de invasão dos patógenos aos alvéolos (Norberg, 2005). Tanto nos isolados individuais quanto nos mistos identificados neste estudo foi encontrada uma maior proporção de microrganismos SCN e *Corynebacterium* spp., que são comensais da glândula mamária e tecidos dos tetos e menos invasivos em relação a outras espécies, o que pode ter evitado alterações significativas nas concentrações das substâncias minerais e condutividade no leite, explicando a independência entre a CEL e a IMM ($p>0,05$).

Em geral, as alterações nos níveis de células somáticas podem se dar por diversos fatores além do fator-resposta à presença da infecção intramamária, estado nutricional e fisiológico dos animais (idade, ordem de parto, período de lactação, sistema imune, etc.) (Harmon, 1994; Bastos e Birgel, 2011; Pizauro, 2013). Além disso, a alta de CCS pode ser constatada em momentos nos quais os animais já debelaram a infecção, contribuindo, então, para a não associação entre os resultados dos métodos de triagem e a IMM.

4. CONCLUSÃO

O CMT, teste Somaticell e condutividade elétrica podem ser aplicados na rotina da fazenda para auxiliar a identificação de búfalas com alta contagem de células somáticas, mas não necessariamente eles indicam a presença de infecção na glândula mamária de búfalas. Por isso, é imprescindível que o monitoramento da CCS seja acompanhado do exame microbiológico do leite para confirmar o diagnóstico da doença em quartos mamários de búfalas.

5. REFERÊNCIAS

Al-Tarazi Y, Albetar M, Alaboudi A (2009) Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International** 42: 374-379.

Bastos PAS, Birgel, EH (2011) Leite de búfalas Murrah criadas em São Paulo (Brasil): Influência da idade, fase de lactação, momento de ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** 9(3): 6-13.

Burton JL, Erskine RJ (2003) Immunity and mastitis Some new ideas for an old disease **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** 19:1–45

Catozzi C, Sanchez Bonastre A, Francino O, Lecchi C, De Carlo E, Vecchio D, Martucciello A, Fraulo P, Bronzo V, Cusco A, D'Andreano S, Ceciliani F (2017) The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PLoS ONE** 12(9):1-20.

Céron-Muñoz, M, Tonhati H, Duarte J, Muñoz-Berrocal, M, Juradogámez H (2002) Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science** 85:2885-2889.

Dhakal IP (2006) Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine** 53(2):81-86.

Fagiolo A, Lai O. (2007) Mastitis in buffalo. **Italian Journal of Animal Science** 6(sup2):200-206.

Haas YH, Veerkamp RF, Barkema HW, Grohn YT, Schukken YH (2004) Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. **Journal of Dairy Science** 87: 95–105.

Harmon RJ (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science** 77:2103-2112.

Hussain R, Javed MT, Khan, A (2012) Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. **Pakistan Veterinary Journal** 32(3):418-421.

Johler S, Stephan R (2010) Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv Lebensmittel hygiene** 61:220-228.

Jorgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Sølverød L, Kvitle B, Mørk T (2016) Streptococcus agalactiae in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks? **Veterinary Microbiology** 184:64-72.

Kapronezai J, Melville P, Benites NR (2005) 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. **Arquivo do Instituto Biológico** 72(2):183-187.

Kashyap DK, Giri DK, Dewangan G (2019) Prevalence of sub clinical mastitis (SCM) in she buffaloes at Surajpur district of Chhattishgarh, India. **Buffalo Bulletin** 38(2):373-381.

Kaşıkcı G, Çetin O, Bingöl EB, Gündüz MC (2012) Relations between electrical conductivity, somatic cell count, *California Mastitis Test* and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 36(1):49-55.

Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison: National Mastitis Council, 1999. 222 p.

Medeiros ES, Barbosa SBP, Jatobá RB, Azevedo SS, Junior JWP, Saukas TN, Albuquerque PPF, Mota RA (2011) Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31(3):219-223.

Montanhini MTM, MORAES DHM, NETO RM (2013) Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 68(392):18-22.

Moroni P, Sgoifo Rossi C, Pisoni G, Bronzo V, Castiglioni B, Boettcher PJ (2006) Relationships Between Somatic Cell Count and Intramammary Infection in Buffaloes. **Journal of Dairy Science** 89:998–1003.

Moura E, Rangel AHN, Melo MC, Borba LHF, Lima Júnior DM, Novaes LP, Urbano SA, Andrade Neto JC (2017) Evaluation of microbiological, cellular and risk factors associated with subclinical mastitis in female buffaloes **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 30(9):1340-1349.

Moura E, Rangel AHN, Urbano SA, Macêdo CS, Novaes LP, Lima Júnior DM (2019) Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* from buffalo milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(8):587-591.

Mustafa YS, Awan FN, Zaman T (2013) Prevalence and antibacterial susceptibility in mastitis in buffalo and cow in district lahore-pakistan. **Pakistan Journal of Pharmacy** 20132(4):29-33.

Norberg E (2005) Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. **Livestock Production Science** 96:129–139.

Pantoja JC, Hulland C, Ruegg PL (2009) Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation **Journal of Dairy Science** 92:139–148.

Philpot WN, Nickerson SC (1991) Mastitis: counter attack. Babson Bros Naperville. 150p.

Pizauro LJ, Silva DG, Santana AM, Clemente V, Lara GHB, Listoni, FJP, Vaz CAN, Vidal-Martins AMC, Ribeiro MG, Faliari JJ (2014) Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66(6):1703-1710

Pizauro LJL (2013) **Perfil bioquímico, condição microbiológica e celularidade do leite de búfalas**. 94f Dissertação (mestrado) - UNESP, Jaboticabal.

Purohit GN, Gaur M, Shekher C (2014) Mammary gland pathologies in the parturient buffalo. **Asian Pacific Journal of Reproduction** 3(4):322-336.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC (2005) Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

Rodrigues ACO, Cassoli LD Machado PF, Ruegg PL (2009) Short communication: Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. **Journal of Dairy Science** 92:990-995.

Rossi RS, Amarante AF, Correia LBN, Guerra ST, Nobrega DB, Latosinski GS, Rossi BF, Rall VLM, Pantoja JCF (2018) Diagnostic accuracy of Somaticell, *California Mastitis Test*, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science** 101:1–10.

Ruegg PL, Pantoja JCF (2013) Understanding and using somatic cell counts as an indicator of milk quality. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 52:101–117.

Salvador RT, Beltran JM, Abes NS, Gutierrez CA, Mingala CN (2012) Short communication: Prevalence and risk factors of subclinical mastitis as determined by the *California Mastitis Test* in water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Nueva Ecija, Philippines. **Journal of Dairy Science** . 95(3):1363-6.

Schalm OW, Noorlander DO (1957) Experiments and observations leading to developments and the *California Mastitis Test*. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 130(5):199-207.

Sharma N, Pandey V, (2011) Comparative evaluation of three tests used for the screening of mastitis. **Indian Journal of Animal Sciences** 81:140-142.

Silva NS, Silveira JÁ, Oliveira CM, Mendonça C, Albernaz TT, Guaraná EL, Lima DH, Barbosa JD (2014) Ocorrência de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas em sistema extensivo no estado do Pará, Brasil. **Bioscience Journal** 30(2):839-846.

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

Vianni MCE, Nader Filho A, Rosseti DJG, Longhi JL, Sicher M (1990) Eficiência do California Mastitis Test (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária** 4(2):3-4.

CAPÍTULO 3 – Avaliação do *California Mastitis Test*, teste Somaticell e Condutividade Elétrica do leite como métodos de triagem de mastite subclínica em búfalas

RESUMO – Os métodos indiretos usados na fazenda para a triagem de animais com mastite subclínica já foram largamente testados para o leite bovino e ainda não há concordância entre os valores de CCS e o limite crítico desses testes que indicam corretamente a presença de inflamação em búfalas. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do *California Mastitis Test*, teste Somaticell, e condutividade elétrica do leite como métodos de triagem no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas. O estudo foi realizado em um rebanho de búfalas no Rio Grande do Norte, Brasil. Foram colhidas 533 amostras de leite de quartos mamários que foram submetidas à contagem eletrônica de células somáticas (CCS) e aos testes de triagem por viscosidade (*California Mastitis Test* – CMT e teste Somaticell - SO) e condutividade elétrica (CEL). A avaliação dos métodos de triagem foi obtida pelas estimativas da sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância (coeficiente kappa) e pela curva ROC. A contagem eletrônica de células somáticas foi tomada como referência para a diferenciação dos quartos mamários com alta e baixa CCS, considerando quatro pontos de corte (150, 200, 280 e 400 mil céls/mL) e diferentes critérios de classificação dos quartos mamários pelos métodos de triagem - “traços, 1+, 2+ e 3+” e “1+, 2+ e 3+” (CMT); SO $\geq$ 150, 200 e 400 céls/mL; e CEL $\geq$ 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mS/cm. O CMT apresentou sensibilidades acima de 85%. A melhor avaliação do CMT para selecionar quartos mamários de búfalas no ponto de corte de 150 mil céls/mL foi no critério Traço, 1+, 2+, 3+. Ambos os critérios tiveram a mesma acurácia e boa concordância para a triagem dos quartos mamários no ponto de corte de 200 mil céls/mL. O critério CMT 1+, 2+ e 3+ foi melhor para selecionar os quartos mamários com 280 e 400 mil céls/mL. O SO $\geq$ 150 e $\geq$ 200 tiveram boa avaliação para o ponto de corte de 150 mil céls/mL. O critério SO $\geq$ 200 foi melhor no ponto de 200 mil céls/mL. Já nos outros dois pontos de corte, a melhor acurácia e concordância do teste foi no critério $\geq$ 400. O critério da CEL que apresentou melhor acurácia e sensibilidade e boa correspondência foi o de 4,0 mS/cm, para a triagem de animais com CCS igual a 150 e 200 mil céls/mL. Para os outros dois pontos de corte de CCS, o critério de 4,5 mS/cm teve melhor acurácia e concordância. A análise do SO e CEL pelas curvas ROC indica os valores limites que maximizam a sensibilidade e especificidade dos testes. Os valores do teste Somaticell e condutividade elétrica que detectam corretamente os quartos mamários de búfalas com contagem de células somáticas de 150, 200, 280 e 400 céls/mL são, respectivamente 253 (244 - 263), 363 (340 - 379), 398 (379 - 418) e 477 (470 - 485) mil céls/mL e 4,5 mS/cm. Os métodos de triagem Somaticell, condutividade elétrica e *California Mastitis Test* podem ser usados para identificar a presença de inflamação em búfalas.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, CCS, infecção intramamária, teste diagnóstico

1. INTRODUÇÃO

A saúde da glândula mamária de fêmeas leiteiras é um elemento de grande importância para as fazendas. A infecção intramamária consiste na invasão da glândula principalmente por bactérias e está associada a perdas quantitativas e qualitativas no leite, aumento do custo de produção e descarte involuntário de animais, dentre outros prejuízos (Céron-Muñoz et al., 2002; Kapronezai et al., 2005; Medeiros et al., 2011; Purohit et al., 2014). Por isso, as fazendas leiteiras de todo o mundo adotam programa de prevenção e controle da doença (Ruegg e Pantoja, 2013; Jorgensen et al., 2016).

As búfalas também são acometidas pela doença na sua forma clínica e subclínica, apesar de possuírem mecanismos de defesa da glândula mamária que as permitem uma melhor resposta frente à infecção em relação às vacas (Tripaldi et al., 2010; Purohit et al., 2014; Kashyap et al., 2019). O exame microbiológico do leite é o melhor método para diagnóstico da mastite subclínica em búfalas, porque é comum se ver animais com alta CCS sem apresentar quadro infeccioso (Medeiros et al., 2011). Como a mastite subclínica é silenciosa, o diagnóstico precisa ser auxiliado pela contagem de células somáticas no leite, que indica a presença de inflamação e dá indícios da presença de infecção, a qual é posteriormente confirmada por método diagnóstico microbiológico (Sharma e Pandey, 2011; Araújo et al., 2012).

Os métodos para contagem de células somáticas do leite atualmente existentes já foram largamente testados para o leite bovino. O método automatizado mais usado para contagem direta de células somáticas é o fluoro-óptico-eletrônico (ISO 13366|IDF 148-2), que contabiliza eletronicamente as células por citometria de fluxo. Na fazenda, a triagem dos animais para o exame diagnóstico por ser realizado por testes práticos que estão associados direta ou indiretamente à inflamação (Philpot e Nickerson, 1991). Os métodos práticos mais conhecidos são baseados em viscosidade, como o *California Mastitis Test* e o teste Somaticell, ou na concentração de minerais, como o método de condutividade elétrica.

Acurácia, sensibilidade e especificidade são características importantes quando se avalia a eficácia de um método empregado no diagnóstico de doenças (Sharma et al., 2010). A acurácia se refere ao grau em que o método alternativo é

capaz de indicar o verdadeiro resultado diagnóstico, pelo método referência (Sharma et al., 2010). A sensibilidade é a capacidade que o teste tem para detectar os indivíduos verdadeiramente positivos (doentes) e a especificidade é a capacidade que ele tem de detectar os verdadeiros negativos (sadios) (Sharma et al., 2010; Araújo et al., 2012). Ao se avaliar a eficiência de um método de triagem para o diagnóstico confiável da saúde de glândula, deve-se priorizar os testes que indicam um menor número de resultados falso-negativos com alta sensibilidade (Santos e Fonseca, 2007).

Erros de diagnóstico com animais falso-positivos ou falso-negativos são esperados, quando se trata dessa temática, tendo em vista que o resultado dos métodos de triagem pode envolver interpretação subjetiva, dependência em sensores, calibração, temperatura dos insumos (reagente) e do leite, etc. Dessa maneira, é imprescindível que o diagnóstico definitivo da doença seja feito com base em resultados microbiológicos e de CCS, e que este último tenha sido obtido por métodos de análises acurados e confiáveis.

A avaliação da eficiência de um método de triagem para a o diagnóstico confiável da saúde de glândula deve considerar a sua capacidade de identificar o quarto mamário com alta CCS (sensibilidade), excluir o quarto mamário com baixa CCS (especificidade), indicar um menor número de resultados falso-positivos ou falso-negativos e o resultado diagnóstico verdadeiro (acurácia) (Santos e Fonseca, 2007; Sharma et al., 2010).

Ainda não existe uma concordância entre o valor de CCS e limite crítico adotado pelos métodos de triagem atualmente existentes que indicam corretamente a presença de inflamação em búfalas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do *California Mastitis Test*, teste Somaticell e condutividade elétrica do leite como métodos de triagem no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal/SP (Protocolo Nº 08551/17).

2.1 Local do estudo e animais

O estudo foi conduzido em um rebanho comercial de búfalas leiteiras localizado na cidade de Taipu, região Agreste do estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2018 e março de 2019.

O rebanho era constituído por fêmeas da raça Murrah e mestiças, manejadas em pasto cultivado em sistema *Voisan*, com predominância de *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria humidicola* e *Panicum maximum* cv. Massai, suplementadas com concentrado comercial, e ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia (às 03h e 15h) em sistema rotativo. Participaram do estudo 440 animais, selecionados aleatoriamente e que aceitavam a ordenha manual para facilitar a colheita de amostras.

2.2 Colheita de amostras de leite

As amostras foram obtidas durante a ordenha da manhã, a partir de quartos mamários aparentemente saudáveis e escolhidos aleatoriamente. Antes da colheita, os tetos foram devidamente higienizados, secos, e desinfetados com álcool 70% e tiveram três jatos de leite descartados. Colheu-se uma amostra asséptica (15 mL) destinada ao exame microbiológico, e uma amostra de 150 mL, destinada às demais análises. Essa amostra foi subdividida em duas alíquotas, uma de 100 mL e outra de 40 mL. A primeira foi usada nos testes de CMT e Somaticell e na análise de condutividade elétrica; e a segunda, continha conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) e foi destinada à contagem eletrônica de células somáticas.

2.3 Análises do leite

A contagem eletrônica de células somáticas foi realizada por citometria de fluxo (ISO 13366-2|IDF 148-2) (Somacount 300, Bentley Instruments Incorporated, Minesota, EUA). O *California Mastitis Testis* (CMT) foi realizado conforme sugerido por Schalm e Noorlander (1957). A reação do leite ao reagente foi interpretada como negativa, traços, 1+ (positiva fraca), 2+ (positiva moderada) e 3+ (positiva forte). O teste foi realizado por um único analista.

O teste Somaticell (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) foi realizado segundo recomendações do fabricante. O teste foi realizado por pessoas treinadas e os tempos foram cronometrados.

A leitura da condutividade elétrica do leite (CEL) de cada quarto mamário dos animais foi obtida em condutivímetro digital (Quimis) devidamente calibrado, com faixa de medição entre 0 e 20 milisiemens por centímetro (mS/cm). Para tanto, foi submergido na amostra um eletrodo capaz de captar a corrente elétrica oriunda da troca entre cátions e ânions do leite, apresentada automaticamente no visor digital do equipamento.

O CMT, CEL, e Somaticell foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LABOLEITE/UFRN, Macaíba, Brasil). A contagem eletrônica de células somáticas foi realizada por citometria de fluxo no Laboratório Clínica do Leite, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP, Piracicaba/SP, Brasil).

2.4 Análise dos dados

No sentido de avaliar os métodos de triagem para o diagnóstico da mastite subclínica dos animais, foram obtidas as estimativas da sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância de cada teste, considerando as proporções dos casos verdadeiro positivos, falso-positivos, verdadeiros negativos e falso-negativos (Sharma et al., 2010). Essas proporções foram obtidas considerando a contagem eletrônica de células somáticas (CCS) como método referência para a diferenciação dos quartos mamários com alta e baixa CCS, considerando quatro pontos de corte (150, 200, 280 e 400 mil céls/mL). Esses pontos de corte foram confrontados com diferentes critérios de classificação das amostras pelos métodos de triagem: CMT = “traços, 1+, 2+ e 3+” e “1+, 2+ e 3+”; SO $\geq$ 150, 200 e 400 céls/mL; e CEL $\geq$ 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0.

A sensibilidade (Se), especificidade (Sp) e acurácia (Ac) dos métodos de triagem foram calculados conforme sugerido por Sharma et al. (2010):

$$Se = \frac{VP}{FN + VP} \times 100 \quad Sp = \frac{VN}{FP + VN} \times 100 \quad Ac = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} \times 100$$

Em que: VP – proporção de casos verdadeiro positivos, FP – falso positivos, VN – verdadeiro negativos, FN – falso negativos.

A concordância entre os resultados dos métodos de triagem e a contagem de células somáticas foi obtida pelo coeficiente Kappa ($k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$), calculado com base na proporção de concordâncias observadas ($Po = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$) e proporção de concordâncias esperadas ($Pe = \frac{(VP + FP)(VP + FN)}{(VP + FP + FN + VN)^2}$). Os valores de $k < 0,4$ indicam concordância fraca; entre 0,4 e 0,75, concordância boa e $k > 0,75$, concordância excelente (Sharma et al., 2010).

Curvas de característica de operação do receptor (ROC) foram obtidas para comparar os testes de triagem Somaticell e CEL e para obter o valor limite dos testes onde a sua sensibilidade e especificidade é maximizada. A comparação entre as curvas dos testes foi realizada calculando-se a área sob a curva (AUC) com o uso da função ROC na linguagem computacional do R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste CMT apresentou sensibilidades acima de 80% (Tabela 1), superior a encontrada por Pizauro (2013) (78%) em um estudo com 1042 amostras de leite bubalino, adotando o critério 1+, 2+ e 3+.

Tabela 1. Avaliação do *California Mastitis Test* (CMT) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).

CCS	CMT	Se (%)	Sp (%)	k	Ac (%)
150	Traço, 1+, 2+, 3+;	93,55	73,91	0,70	87,62
	1+, 2+, 3+	80,11	88,82	0,63	82,74
200	Traço, 1+, 2+, 3+;	96,15	66,67	0,67	85,37
	1+, 2+, 3+	85,21	85,64	0,69	85,37
280	Traço, 1+, 2+, 3+;	98,01	59,05	0,60	81,05
	1+, 2+, 3+	89,70	80,17	0,70	85,55
400	Traço, 1+, 2+, 3+;	99,20	49,65	0,47	72,80
	1+, 2+, 3+	94,38	71,48	0,65	82,18

Se: Sensibilidade; Sp: especificidade; k: concordância; Ac: acurácia.

A máxima sensibilidade encontrada para o CMT foi 99,2%, quando adotado o critério Traço, 1+, 2+, 3+ com CCS no ponto de corte de 400 mil céls/mL. Entretanto, esse critério apresentou a correspondência mais fraca e foi o menos acurado. Desta maneira, fica demonstrado que a melhor avaliação do teste deve ser aquela que

combina primeiramente a máxima acurácia, com boa concordância ($k \geq 0,40$) e alta capacidade de detecção dos quartos mamários acima do ponto de corte (sensibilidade), que são aqueles com maior probabilidade de apresentar inflamação (alta CCS).

A melhor avaliação do CMT para selecionar quartos mamários de búfalas com CCS a partir de 150 mil céls/mL foi no critério Traço, 1+, 2+, 3+, que apresentou maior acurácia, concordância e sensibilidade em relação ao outro critério (Tabela 1). Ambos os critérios tiveram a mesma acurácia e boa concordância para a triagem dos quartos mamários no ponto de corte de 200 mil céls/mL, mas o primeiro critério foi mais sensível. Eliminando a reação de CMT traço como critério para seleção dos quartos mamários com inflamação, decresceu a sensibilidade e aumentou a especificidade em todos os pontos de corte da CCS. Ferreira et al. (2019) encontraram a mesma relação entre a sensibilidade e a especificidade quando reduziram o rigor no critério do teste indireto para identificação de anemia em pequenos ruminantes.

Dentre todos os testes, as concordâncias mais fortes foram encontradas no teste Somaticell (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do teste Somaticell (SO) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).

CCS	SO	Se (%)	Sp (%)	k	Ac (%)
150	150	93,28	75,78	0,71	87,99
	200	92,20	83,23	0,75	89,49
	400	87,37	89,44	0,73	87,99
200	150	95,56	67,69	0,67	85,37
	200	94,97	74,87	0,72	87,38
	400	81,66	84,62	0,73	86,64
280	150	59,48	0,76	0,59	80,68
	200	96,35	65,52	0,63	82,56
	400	88,04	75,86	0,79	89,61
400	150	97,19	49,30	0,45	71,67
	200	97,19	54,93	0,50	74,40
	400	93,17	81,69	0,74	87,01

Se: Sensibilidade; Sp: especificidade; k: concordância; Ac: acurácia.

Na triagem dos quartos mamários com CCS no ponto de corte de 150 mil céls/mL, o Somaticell foi mais acurado e teve maior concordância no critério ≥ 200 , mas o critério ≥ 150 também teve boa avaliação. No ponto de corte de 200 mil céls/mL, sua melhor avaliação foi obtida no critério ≥ 200 que resultou em uma sensibilidade

de 94,97%, com boa concordância, e acurácia acima de 87%. Já nos outros dois pontos de corte, a melhor acurácia e concordância do teste foi no critério ≥ 400 . Rodrigues et al. (2009) validaram o Somaticell para leite bovino, encontrando uma concordância de 0,92 com a CCS por citometria de fluxo, valor superior aos encontrados nesse estudo.

Os menores valores de acurácia e concordância foram obtidos na avaliação da condutividade elétrica (Tabela 3). O teste também apresentou a maior amplitude de sensibilidade, entre 22,58 e 100%, por considerar um maior número de critérios.

Tabela 3. Avaliação da condutividade elétrica (CEL) para triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas a partir de quatro diferentes pontos de corte de contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL) (n=533).

CCS	CEL	Se (%)	Sp (%)	k	Ac (%)
150	3,0	100,00	1,86	0,03	70,36
	3,5	98,12	18,63	0,21	74,11
	4,0	85,22	64,60	0,50	78,99
	4,5	65,86	88,82	0,46	72,80
	5,0	47,85	95,65	0,33	62,29
	5,5	33,33	98,14	0,22	52,91
	6,0	22,58	98,76	0,14	45,59
200	3,0	100,00	1,54	0,02	63,98
	3,5	97,93	15,38	0,16	67,73
	4,0	86,39	57,95	0,46	75,98
	4,5	69,23	85,13	0,50	75,05
	5,0	50,59	92,82	0,37	66,04
	5,5	35,50	96,41	0,26	57,79
	6,0	24,85	98,97	0,19	51,97
280	3,0	100,00	1,29	0,02	57,04
	3,5	98,34	13,79	0,16	61,54
	4,0	88,04	53,02	0,46	72,80
	4,5	71,76	79,74	0,50	75,23
	5,0	53,49	89,66	0,37	69,23
	5,5	39,20	96,12	0,26	63,98
	6,0	27,91	99,14	0,19	58,91
400	3,0	100,00	1,06	0,02	47,28
	3,5	99,20	12,32	0,16	52,91
	4,0	89,96	47,18	0,46	67,17
	4,5	75,50	73,59	0,50	74,48
	5,0	58,23	85,92	0,37	72,98
	5,5	44,98	94,72	0,26	71,48
	6,0	31,73	97,54	0,19	66,79

Se: Sensibilidade; Sp: especificidade; k: concordância; Ac: acurácia.

Através do critério de $CEL \geq 3,0$ não foram identificados casos falso negativos, levando aos 100% de sensibilidade do teste, mas também foram encontrados poucos casos verdadeiro negativos, motivando a fraca correspondência do teste com a CCS. Isso está relacionado com o conjunto de valores reais encontrados para a condutividade, que variaram de 2,89 e 10,30 mS/cm, com apenas três observações abaixo de 3,0 mS/cm. No estudo de Moura et al. (2017) a média de condutividade no leite do grupo de búfalas com maior CCS (685 mil céls/mL) foi de 3,24 mS/cm, enquanto que nas búfalas com menor CCS (470 mil céls/mL) foi de 3,09 mS/cm. Outros autores identificaram médias de CEL maiores em búfalas com e sem mastite que foram, respectivamente, 4,62 e 4,05 (Bastos e Birgel, 2011) e 6,1 e 4,9 mS/cm (Hussain et al., 2012). Não foram encontrados estudos que relatam CEL acima de 10 mS/cm. Deve ser ponderado o fato de que a condutividade elétrica é influenciada pela composição físico-química (proporção de gordura e minerais) e pela temperatura do conteúdo analisado (Norberg, 2005). Diante dessa análise, demonstra-se que os critérios devem ser definidos de acordo com a realidade de cada rebanho, considerando a média de CEL característica e histórica para os seus animais saudáveis. Nesse estudo, o critério da CEL que apresentou melhor acurácia e sensibilidade e boa concordância foi o de 4,0 mS/cm, para a triagem de animais com CCS igual a 150 e 200 mil céls/mL. Para os outros dois pontos de corte de CCS, o critério de 4,5 mS/cm teve melhor acurácia e concordância.

Em testes de triagem que indicam a necessidade de procedimentos de riscos como cirurgias, por exemplo, deve-se evitar resultados falso-positivos, que façam o indivíduo ser submetido ao procedimento desnecessariamente. Nessa situação, o valor limite do teste deve ser definido para que aumente a especificidade. Já em triagens para prevenção de transmissão de infecções, como na mastite subclínica, em que a falha da detecção de casos positivos provoca risco para a disseminação da doença na população, o limite deve ser definido para que sejam evitados resultados falso-negativos e se alcance o máximo de sensibilidade do teste (Dohoo et al., 2009).

No aspecto de sanidade do úbere, se um método indireto aponta casos falso-positivos em grande proporção durante a triagem dos quartos mamários, ele sugere uma condição de alta CCS, quando deveria indicar baixa CCS. Isso leva o analista a realizar o exame microbiológico desnecessariamente ou direcionar equivocadamente

o descarte, tratamento ou mudanças nas práticas de manejo sem que o animal esteja doente. E quando o método aponta muitos casos falso-negativos, ele pode contribuir para que se mantenha no rebanho animais com a mastite silenciosa, que atuam como reservatórios de patógenos e disseminadores da mastite.

Dentro do mesmo critério de cada teste de triagem fica evidente que a especificidade aumenta, a medida em que a sensibilidade decresce (Tabelas 1 a 3). Esse comportamento das características dos testes é explicado pela relação que elas têm com a proporção dos casos falsos. A sensibilidade é inversamente proporcional ao número de casos falso-negativos e a especificidade, ao número de falso-positivos. Desta maneira, quando se aumentou o ponto de corte da CCS, o número de casos falso-negativos reduziu (aumentando a sensibilidade do teste) e o de falso-positivos aumentou por compensação, reduzindo a especificidade. O ideal é que o critério do teste maximize a sensibilidade e a especificidade de maneira equilibrada.

A curva ROC permite identificar o valor limite no qual a sensibilidade e a especificidade são maximizadas. Esse valor é chamado de ponto de truncamento, que está representado no encontro entre as retas perpendiculares e entre parênteses na Figura 1.

Para selecionar quartos mamários com CCS maior que 150 mil céls/mL (Figura 1A), a curva ROC indica que o melhor valor de SO a ser adotado é 253 mil céls/mL e o de CEL é igual a 4,52 mS/cm, mesmo valor de CEL identificado para o ponto de corte de CCS em 280 e 400 mil céls/mL. Para selecionar quartos mamários com CCS maior que 200, 280 e 400 mil céls/mL através do SO, o melhor critério seria considerar o resultado do teste em 363, 398 e 477 mil céls/mL, respectivamente.

Os resultados do Somaticell são lidos na escala de graduação do próprio tubo utilizado para o teste (Apêndice, Figura 3). Como os valores dessa graduação são fixos e em intervalos desiguais, eles não informam com exatidão a quantidade de células, apenas a estimativa. Por isso, o ponto de truncamento não foi exatamente igual ao resultado usado como ponto de corte no método referência, mas próximo dele (com margens de erro para mais). Para facilitar a triagem dos animais pelo Somaticell com o auxílio da graduação fornecida no próprio teste, pode-se adotar como critério o intervalo entre o primeiro valor da escala abaixo do ponto de truncamento até o primeiro valor acima do ponto de truncamento. Assim, os critérios no Somaticell para

os pontos de corte de 150, 200, 280 e 400 mil céls/mL podem ser, respectivamente, valores entre 244 e 263 (truncamento = 253 mil céls/mL), entre 340 e 379 (truncamento = 363 mil céls/mL), entre 379 e 418 (truncamento = 398 mil céls/mL), e entre 470 e 485 (truncamento = 477 mil céls/mL).

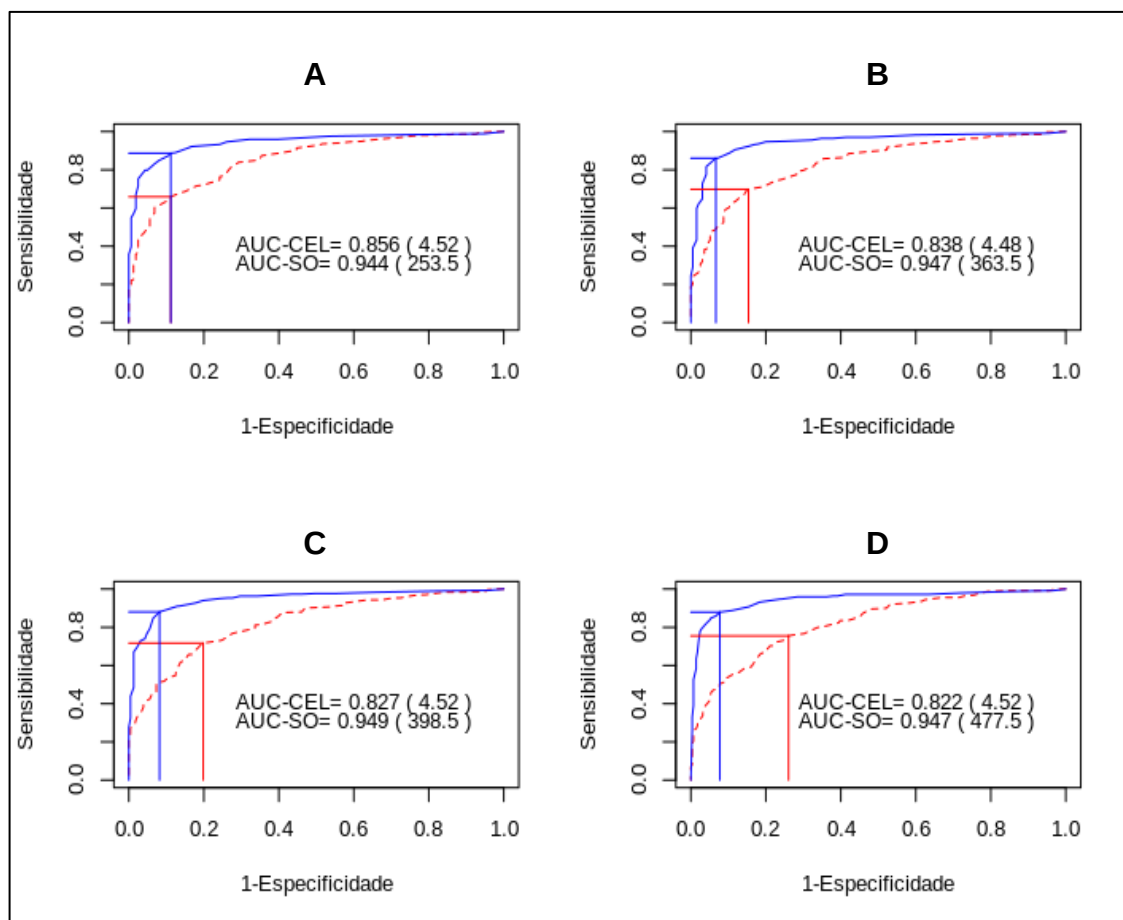


Figura 1. Curvas ROC do teste Somaticell (SO, —) e condutividade elétrica (CEL, ---) para a triagem de mastite subclínica em quartos mamários de búfalas com alta CCS, considerando quatro diferentes pontos de corte da contagem de células somáticas - 150 (A), 200 (B), 280 (C) e 400 (D) mil céls/mL. AUC = área sob a curva. O número entre parênteses é o valor limite (localizado no encontro das retas perpendiculares) que maximiza a sensibilidade e especificidade do teste.

A curva também possibilita verificar o desempenho do teste de triagem pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC). Valor de AUC igual a 1,0 significa que existe a máxima correspondência entre o teste e o diagnóstico (100% de sensibilidade e de especificidade). Ambos os testes apresentaram AUC acima de 0,80, próximo de 1,0. Entretanto, o Somaticell apresentou maior AUC em relação à CEL, independente do ponto de corte de CCS. O teste Somaticell tem uma relação mais direta com a CCS,

uma vez que sua resposta depende da proporção de células presentes no leite; já a condutividade elétrica tem mais a associação com o equilíbrio de minerais, apesar de apresentar correlação positiva com a CCS (Kaşikçi et al., 2012; Bastos e Birgel, 2011; Moura et al., 2017).

Vale ressaltar que as legislações que norteiam as indústrias e fazendas consideram valores limites de contagem bacteriana e de células somáticas no leite. No Brasil, o requisito para a CCS no leite de búfalas é o mesmo adotado para o leite bovino (400 mil céls/mL; Brasil, 2018) e é um importante limiar de referência para o manejo de sanidade de glândula mamária das fazendas. Além dessa prerrogativa, a escolha dos pontos de corte depende do objetivo e necessidades do programa de controle de mastite de cada rebanho. Pontos de corte mais baixos são usados para aumentar a pressão na seleção dos animais para exames e tratamentos (Ferreira et al., 2019) e geralmente são aplicados em rebanhos de média a alta especialização para a produção de leite ou que possuem maior rigor para o controle da doença e qualidade do leite.

Os métodos de triagem por viscosidade (CMT e Somaticell) podem ser realizados em poucos minutos ao lado do animal ou com leite resfriado. A condutividade elétrica é o único método realizado na fazenda que pode ser automatizado. Quando acoplado ao sistema, ele realiza uma mensuração a cada ordenha, inclusive por quarto mamário (Norberg, 2005), permitindo a formação de um histórico de dados acumulados pertencente a cada animal, que pode servir de referência para detecção anormalidades individualmente. Diante dessas vantagens, a associação dos métodos de triagem por viscosidade e condutividade pode ser uma escolha assertiva para os programas de prevenção e controle da doença.

Ainda assim, os métodos de triagem Somaticell, condutividade elétrica e CMT somente devem ser usados para identificar a presença de inflamação, porque eles não refletem adequadamente o status bacteriológico da glândula mamária (Sharma et al., 2010). Nem sempre búfalas com altas contagens de células somáticas no leite apresentam exame microbiológico positivos e vice-versa (Jorge et al., 2005; Kapronezai et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Pizauro, 2013). Sugere-se, portanto, que o diagnóstico da mastite em búfalas seja baseado nos resultados históricos de

contagem de células somáticas do leite acompanhados prioritariamente do exame microbiológico.

4. CONCLUSÃO

Os métodos de triagem Somaticell, condutividade elétrica e *California Mastitis Test* podem ser usados para identificar a presença de inflamação e alta CCS em búfalas. O critério do CMT que considera a reação de traço foi melhor para selecionar os quartos mamários com CCS a partir de 150 e 200 mil céls/mL. Já para uma triagem menos rigorosa, com CCS nos pontos de corte 280 e 400 mil céls/mL, a melhor avaliação do CMT foi no critério que não considera a reação de traço. As melhores avaliações para o teste Somaticell nos pontos de corte em 150 e 200 mil céls/mL foram nos critérios ≥ 200 ; e em 280 e 400 mil céls/mL, foi no critério ≥ 400 . De forma mais específica, os valores críticos do teste Somaticell e condutividade elétrica que maximizam a capacidade de detectar corretamente os quartos mamários de búfalas com contagem de células somáticas de 150, 200, 280 e 400 céls/mL são, respectivamente 253 (244 - 263), 363 (340 - 379), 398 (379 - 418) e 477 (470 - 485) mil céls/mL e 4,5 mS/cm.

5. REFERÊNCIAS

Araújo VM, Rangel AHN, Bezerra KC, Andrade KD, Guerra MG (2012) Avaliação de testes rápidos para análises da contagem de células somáticas de leite cru de tanques. **Acta Veterinaria Brasilica** 6(4):321-324.

Bastos PAS, Birgel, EH (2011) Leite de búfalas Murrah criadas em São Paulo (Brasil): Influência da idade, fase de lactação, momento de ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** 9(3): 6-13.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 30 nov. 2018.

Carvalho, LB, Amaral, FR, Brito, MAV, Lange, CC, Brito, JR, Leite, RC (2007) Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59(1): 242-245.

Céron-Muñoz, M, Tonhati H, Duarte J, Muñoz-Berrocal, M, Juradogámez H (2002) Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science** 85:2885-2889.

Dohoo I, Martin SW, Stryhn H (2009) Veterinary Epidemiologic Research. Ver Inc., Charlottetown, PEI, Canada. 865 p.

Ferreira JB, Sotomaior CS, Bezerra AC, Silva WE, Leite JH, Sousa JE, Biz JF, Façanha DA (2019) **Sensitivity and specificity of the FAMACHA® system in tropical hair sheep** Tropical Animal Health and Production 51(6):1767-1771.

Hussain R, Javed MT, Khan, A (2012) Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. **Pakistan Veterinary Journal** 32(3):418-421.

Jorge AM, Andrighetto C, Strazza MRB, Correa RC, Kasburgo DG, Piccinin A, Victoria C, Domingues PF (2005). Correlação entre o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia** 34(6):2039-2045.

Jorgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Sølverød L, Kvitle B, Mørk T (2016) Streptococcus agalactiae in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks? **Veterinary Microbiology** 184:64-72.

Kapronezai J, Melville P, Benites NR, 2005. 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. **Arquivo do Instituto Biológico** 72(2):183-187.

Kashyap DK, Giri DK, Dewangan G (2019) Prevalence of sub clinical mastitis (SCM) in she buffaloes at Surajpur district of Chhattishgarh, India. **Buffalo Bulletin** 38(2):373-381.

Kaşıkcı G, Çetin O, Bingöl EB, Gündüz MC (2012) Relations between electrical conductivity, somatic cell count, *California Mastitis Test* and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 36(1):49-55.

Medeiros ES, Barbosa SBP, Jatobá RB, Azevedo SS, Junior JWP, Saukas TN, Albuquerque PPF, Mota RA (2011) Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31(3):219-223.

Moura E, Rangel AHN, Melo MC, Borba LHF, Lima Júnior DM, Novaes LP, Urbano SA, Andrade Neto JC (2017) Evaluation of microbiological, cellular and risk factors associated with subclinical mastitis in female buffaloes **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 30(9):1340-1349.

Norberg E (2005) Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. **Livestock Production Science** 96:129–139.

Philpot WN, Nickerson SC (1991) **Mastitis: counter attack**. Babson Bros Naperville. 150p.

Pizauro LJL (2013) **Perfil bioquímico, condição microbiológica e celularidade do leite de búfalas**. 94f Dissertação (mestrado) - UNESP, Jaboticabal.

Purohit GN, Gaur M, Shekher C (2014) Mammary gland pathologies in the parturient buffalo. **Asian Pacific Journal of Reproduction** 3(4):322-336.

Rodrigues ACO, Cassoli LD Machado PF, Ruegg PL (2009) Short communication: Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. **Journal of Dairy Science** 92:990-995.

Ruegg PL, Pantoja JCF (2013) Understanding and using somatic cell counts as an indicator of milk quality. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 52:101-117.

Santos MV, Fonseca LFL (2007) **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Editora Manole, 1ªed.

Sharma N, Pandey V, (2011) Comparative evaluation of three tests used for the screening of mastitis. **Indian Journal of Animal Sciences** 81:140-142.

Sharma N, Pandey V, Sudhan NA (2010) Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine** 74:51-62.

Tripaldi C, Palocci G, Catta M, Orlandini S, Amatiste S, Di Bernardini R, Catillo G (2010) Effects of mastitis on buffalo milk quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 23(10):1319-1324.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

Dentre os principais resultados desse estudo destaca-se que os resultados do CMT, do Somaticell e da CEL são capazes de identificar com acurácia os quartos mamários com diagnóstico verdadeiro pela CCS eletrônica, auxiliando a triagem de mastite subclínica de búfalas na fazenda.

A forma de interpretação do resultado é a principal diferença entre os métodos CMT e Somaticell, que são baseados em viscosidade – o primeiro é mais visual e subjetivo; já o segundo é orientado pelos valores lidos diretamente. Entretanto, ambos os métodos são capazes de separar animais com alta e baixa CCS. O custo por amostra testada é basicamente para aquisição dos kits comerciais. A raquete plástica usada no CMT tem alta durabilidade, entretanto, o teste requer reposição de reagente que custa menos de R\$ 0,10/amostra e pode ser encontrado facilmente em lojas de insumos para pecuária. Em contrapartida, o material para análise de uma amostra pelo Somaticell é de acesso mais dificultoso, dependendo da região do país, e seu custo é de aproximadamente R\$ 5,00/amostra. Com relação à facilidade e preço de aquisição, o CMT é mais vantajoso em relação ao Somaticell.

Dentre os três testes de triagem, o de condutividade elétrica é o único que requer equipamento eletrônico, e, por isso, precisa de maior investimento inicial. Sensores de condutividade elétrica podem vir acoplados à linha de ordenha, e com custo diluído na aquisição do equipamento. Já considerando a versão portátil (baterias) ou de bancada (energia elétrica), o preço de compra varia de R\$ 400,00 a R\$ 5.000,00. Investimento à parte, o custo por amostra analisada pelos medidores de condutividade é irrisório, uma vez que não requer outros insumos, além da solução padrão de calibração que tem validade longa.

Vale ressaltar que os métodos indiretos para a triagem de mastite subclínica realizados na fazenda não substituem a contagem eletrônica de células somáticas, realizada em laboratório, que é mais sensível, precisa e prática. Cabe ao gestor da fazenda eleger o método que melhor atende aos seus critérios de custo-benefício e praticidade para a seleção dos animais que terão o diagnóstico laboratorial feito posteriormente.

Uma limitação desse estudo foi a colheita de amostras diretamente do teto dos animais durante a rotina de ordenha. Essa limitação se mostra como uma dificuldade

para os manejos do programa de controle de mastite em rebanhos bubalinos que adotam ordenha mecânica. Uma solução pode ser a análise de amostras de leite compostas, obtidas pelo coletor da ordenhadeira, para acompanhamento e seleção de animais a partir dos pontos de corte de CCS mais sensíveis, sugeridos por este trabalho. Quando, então, se deve colher as amostras de forma asséptica diretamente dos tetos.

A bubalinocultura, de modo geral, ainda incorpora muitos conhecimentos construídos na área da bovinocultura leiteira. Na temática de sanidade e manejo de búfalas, por exemplo, muito ainda precisa ser elucidado e assimilado pelas fazendas. Ainda podem ser encontradas fazendas que desprezam os riscos de infecções intramamárias em búfalas e negligenciam a prevenção, monitoramento incisivo e até o tratamento da doença, justificando com o argumento de que as mesmas são “rústicas” e “resistentes”. Somado a isso, a literatura sobre o tema ainda é escassa, principalmente no Brasil. Entretanto, é imprescindível que os sistemas de produção de búfalas estejam completamente pautados no conhecimento técnico-científico, a medida em que caminham e lançam mão da tecnificação e profissionalização, com vistas aos ganhos em eficiência, lucratividade e longevidade.

Nesse contexto, ressalta-se a necessidade de conscientização dos técnicos e produtores rurais sobre o tema. Os rebanhos bubalinos carecem de atenção sob a perspectiva dos programas de prevenção e controle da mastite, além das demais doenças. Precisa-se assumir que a doença é mais recorrente do que se imagina e, depois, implementar o seu monitoramento e controle nos rebanhos de modo amplo e rigoroso, fazendo uso dos registros zootécnicos, profiláticos, epidemiológicos e de tratamentos, baseados no que de fato ocorre.

Século XXI, tempos modernos. Nesses últimos anos pudemos testemunhar o nascimento da nova revolução – o mundo 4.0. Novas formas de perceber, interpretar e solucionar problemas, lançando mão da tecnologia e conectividade. Os “novos profissionais” e consumidores precisam estar “on-line”. A “inteligência artificial” amadureceu, nasceu a “internet das coisas” e, na pecuária, o “Leite 4.0”. Urge a atualização e a visão tecnológica e inovadora, que estão entrelaçadas à capacidade de adaptação, agilidade e eficiência dos consultores e empresas. Se a gestão de informações já era importante para a competitividade dos sistemas de produção

animal e toda a cadeia produtiva do leite, agora ela é vital. Diante disso, propõe-se que, as fazendas e a comunidade científica comprometam-se com a gestão de suas informações para que trabalhos futuros sejam desenvolvidos, por exemplo, a partir da análise de bancos de dados robustos. Assim, estarão aptos para disponibilizar conhecimentos mais profundos no contexto da sanidade da glândula mamária e manejo de ordenha de búfalas. Espera-se que não só a bubalinocultura como todo o setor absorvam os pontos positivos dessa modernidade, estejam voltados à ciência dos seus detalhes “fisiológicos” e ao aprimoramento de suas práticas. Assim, dar-se-á continuidade ao caminho...

APÊNDICE



Figura 1. Principais pontos da rotina de ordenha em sistema rotatório com capacidade para 40 búfalas – Sala de espera (A), detalhe do portão automático para acesso da cabine na plataforma rotatória (B), procedimento de higiene pré-ordenha (C), animais durante a ordenha (D); aplicação de solução pós-ordenha (E); e saída do animal com a plataforma em movimento (F).

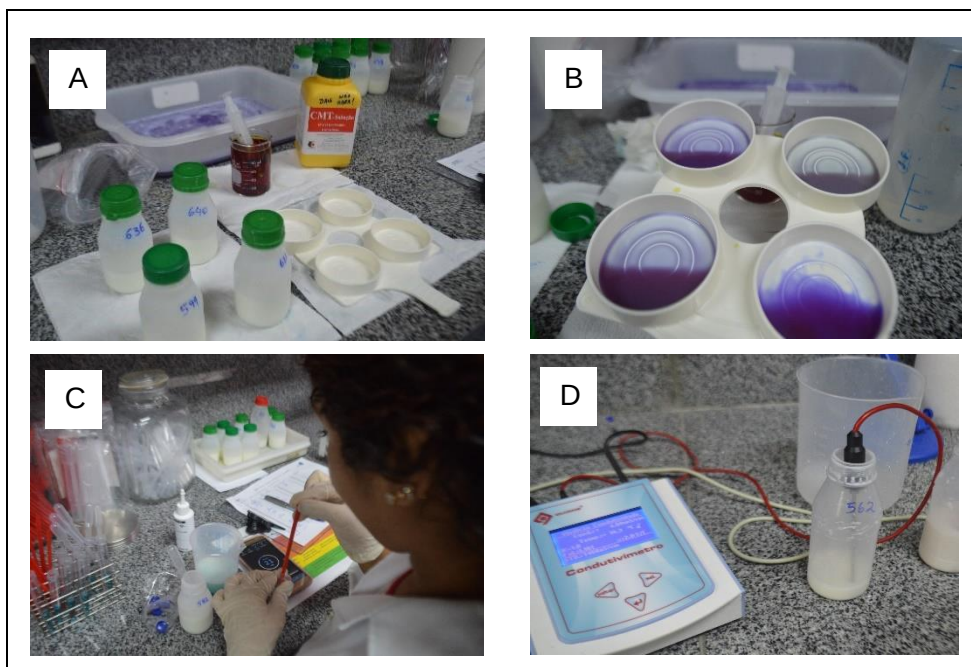


Figura 2. Métodos de triagem realizados em laboratório – *California Mastitis Test* (A e B), teste Somaticell (C) e condutividade elétrica (D).

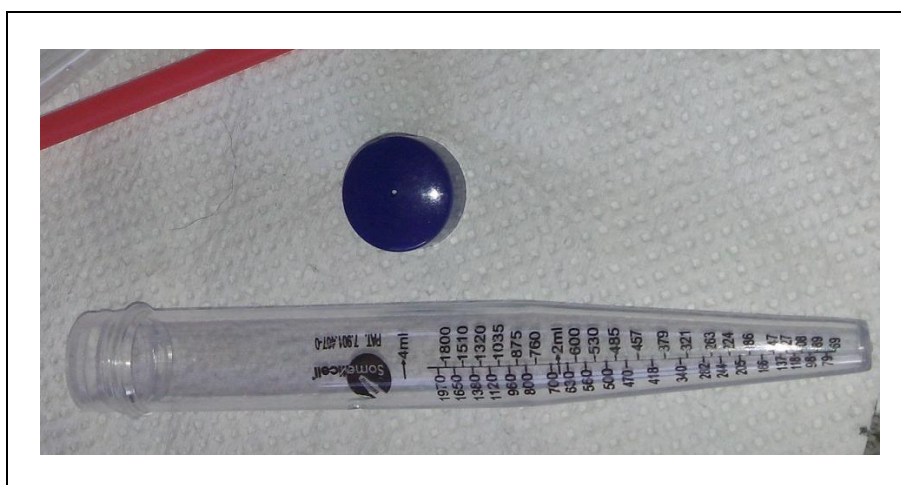


Figura 3. Tubo com graduação de valores fixos usado para realização e leitura dos resultados do teste Somaticell (Somaticell, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA).