ANDREA VÁSQUEZ GARCÍA

**Avaliação, isolamento e identificação dos principais microrganismos
causadores de mastite subclínica em búfalas**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Raul Franzolin Neto

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

V328a Vázquez García, Andrea
Avaliação, isolamento e identificação dos principais
microorganismos causadores de mastite subclínica em
búfalas / Andrea Vázquez García. -- Pirassununga, 2014.
78 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Raul Franzolin Neto.

1. Antibióticos 2. Contagem de células Somáticas
3. Espécies bacterianas 4. Leite de búfala. I. Título.

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Dorís García e Arcesio Vasquez
pelo amor, dedicação, apoio e incentivo
em todos os momentos de nossa caminhada.*

*A minha irmã Glória Lorena que sempre acreditou em mim,
pelo amor e companhia nesta etapa.*

*A meu noivo Julian Eduardo Mejía
pelo amor, paciência, carinho, dedicação em
todos os momentos que passamos juntos nesta nossa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de fazer meus estudos de pós-graduação no Brasil, transformando-se numa experiência única e maravilhosa. Sem ela nada seria possível.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES- pela bolsa de estudo concedida durante meu mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, localizada no Campus Pirassununga e a todos os professores pelos ensinamentos obtidos com a oportunidade de realização deste curso.

Aos professores Raul Franzolin Neto e Ricardo Luiz Moro de Sousa, pela constante atenção, apoio e orientação durante o trabalho e elaboração dessa dissertação.

Às propriedades rurais de bubalinocultura que abriram suas porteiras e permitiram a realização desse trabalho, demonstrando o interesse de associar a pesquisa científica com a produção comercial de leite visando elevar a qualidade de seus produtos.

À Sabrina Ribeiro Almeida Queiroz pela amizade e orientação em cada uma de minhas dúvidas, por sempre ter disposição para me escutar.

Às técnicas de laboratório, Silvia Helena De Seraphin Godoy e Flavia Simone Munin, pela valiosa amizade, incentivo e ajuda nas experimentações.

Aos colegas do laboratório por dividimos e compartilharmos esforços na conquista de mais uma etapa da vida: Erika Peluque, Anna Alencar, Marcelo Candido, Bruna Heloise, Leticia Monteiro, Juliana Baldin, Euder Michelin, Samara Maganha, Juliana Navarro, Eurico Arruda, Marina Pinheiro, Criskely Batinga.

Aos colegas de coletas de amostras, Thaysa dos Santos Silva, Juan Camilo Navarro e Hugo Telles Costa; foram dias de acordar bem cedo, viajar por horas e de suportar sol intenso, mas quando o trabalho acaba você percebe que valeu a pena.

Aos familiares, Oliva Vásquez, Lucelly Garcia, Alberto Vásquez, Margarita Garcia, Dora Vásquez, Fanny Garcia, Libia Vásquez, Zulay Garcia, Adiel Garcia, Mariela Garcia, Joaquin Garcia, por compreenderem minha ausência nesta reta final.

Aos professores da Colômbia, Liliana Serna Cock e Carlos Humberto Mora Bejarano, que me ajudaram nesta conquista e foram motivo de inspiração.

Aos amigos e amigas da Colômbia, Claudia Viviana Luna, Jennifer Lozano, Diana Perdomo, Lorena Figueroa, Marcela Jimenez, Carlos Andres Rengifo, Juan Camilo Briñas, Alfredo Zuñiga, Miguel Leon, Alejandra Mora, Vivi Restrepo, Catalina Torres e Monica Quijano.

Aos amigos e amigas que conheci no Brasil, Letícia Fernandes, Sarah Lee, Laura Solorzano, Diana Zapata, Angélica Patricia Ordoñez, Shirley Andrea Flores, Lea Sturton, Lorena Galvis, Mayra Oliveira, Diogo Sartori, Cristian Flaker, Adriana Bordignon, Jaiber Rodriguez, German Ayala, Lina Pulido, Sérgio Adames, Lina Rayo, Susana Dos Santos, Carolina Bedoya, Laura Reyes, Ana Maria Munera, Juliana Palacio, July Alexandra Hernandez, Natália Lopez, William Cañon-Franco, Fernando Koja, Juan Kamilo Morales, Cesar Cocuy, Camilo Rodriguez, Glória Urrea, Evelyn Antonelly e Jose Raúl Lopez.

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."*

(Martin Luther King)

RESUMO

VASQUEZ G., A. **Avaliação, isolamento e identificação dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica em búfalas.** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A exploração dos bubalinos para a produção de leite e elaboração de seus derivados é uma atividade que tem crescido nos últimos anos no Brasil. Os búfalos apresentam problemas sanitários semelhantes aos bovinos. Objetivou-se neste estudo, desenvolver o isolamento e caracterização fenotípica e molecular dos principais microrganismos causadores de mastites subclínicas em búfalas (*Bubalus bubalis*) em quatro granjas leiteiras da região central do Estado de São Paulo, Brasil, através dos testes contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), caracterização fenotípica e bioquímica dos microrganismos isolados e confirmação pela técnica de PCR, assim como também avaliar o perfil de sensibilidade bacteriana aos principais antimicrobianos para os patógenos mais frequentemente isolados em casos de mastite subclínica em bubalinos. Foram coletadas 20 amostras de leite de búfalas em lactação no ano de 2013, que apresentaram CCS acima de 200.000 cel/mL em controles realizados pelas fazendas. Tendo como base a Instrução Normativa Nº62 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que trata de padrões microbiológicos para leite bovino. Das 20 amostras analisadas neste trabalho, apenas 1 (5%) estava dentro do padrão estabelecido (1×10^4 UFC/mL) com uma variação nos resultados encontrados de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL a $57,7 \times 10^5$ UFC/mL. A CCS apresentou uma mediana de 721.000 cel/mL no leite (valor mínimo: 205.000, valor máximo: 2.264.000), indicando presença de mastite subclínica. Constatou-se que os agentes com maior frequência de isolamento foram *Staphylococcus epidermis* (17%), *Staphylococcus aureus* (15%) e *Bacillus* spp. (14%). Os ensaios de PCR confirmaram os resultados obtidos com o isolamento na caracterização fenotípica e bioquímica de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*. Com a realização do antibiograma, foi possível traçar um perfil de sensibilidade aos diferentes antibióticos testados. O estudo de sensibilidade bacteriana detectou maior sensibilidade (100%) do *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* aos antibióticos gentamicina e vancomicina; para o gênero *Streptococcus* spp. à gentamicina e oxacilina e para *Escherichia coli* à ampicilina.

Palavras-chave: Antibióticos; bactérias; búfalo; contagem de células somáticas; leite de búfala; mastite.

ABSTRACT

VASQUEZ G., A. **Evaluation, isolation and identification of the main microorganisms causing subclinical mastitis in buffaloes.** 2014. M.Sc. 78 f. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The exploration of buffaloes for milk production and dairy products is an activity that has grown in recent years in Brazil. Buffaloes present similar health problems for cattle. The objective of this study was to determine the isolation and the phenotypic and molecular characterization of the main microorganisms causing of subclinical mastitis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four dairy farms in the central region of state of Sao Paulo, Brazil, through testing somatic cell count (SCC), standard plate count (SPC), phenotypic and biochemical characterization of the microorganisms isolated and confirmed by PCR technique, as well as to evaluate the profile of bacterial sensitivity to antibiotics given for the major pathogens commonly isolated in cases of subclinical mastitis in buffaloes. Twenty milk samples from lactating buffaloes were analyzed in 2013 that have presented SCC above 200,000 cells/mL. Based on the Instruction Normative N°62 of 2011 of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) which deals with microbiological standards for bovine milk, of the 20 samples analyzed in this study, only 1 (5%) was within the established standard (1×10^4 CFU/mL) with a variation in the results of 1.0×10^4 CFU/mL to 57.7×10^5 CFU/mL. The CCS showed a median of 721,000 cells/mL in the milk (minimum value; 205,000, maximum value: 2,264,000), indicating the presence of subclinical mastitis. It was found that agents with higher frequency of isolation were *Staphylococcus epidermis* (17%), *Staphylococcus aureus* (15%) and *Bacillus* spp. (14%). The PCR assays confirmed the results obtained with isolating in the phenotypic and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp. and *Escherichia coli*. With the realization of the antibiogram was possible to draw a profile of resistance of different antibiotics tested. The study of bacterial sensitivity showed that for higher sensitivity (100%) of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to antibiotics gentamicin and vancomycin; for the genus *Streptococcus* spp. to gentamicin and oxacillin and for *Escherichia coli* to ampicilin.

Keywords: Antibiotics; bacteria; buffalo; somatic cell count; buffalo milk; mastitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação gráfica do efetivo de bubalinos segundo as Grandes Regiões do Brasil 2010-2011.	20
Figura 2. Fluxograma da metodologia usada para o isolamento e caracterização bioquímica dos microrganismos.	36
Figura 3. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A–Mão de obra. B – Uso de luvas. C - Equipamento de ordenha. D - pré- <i>dipping</i> e pós- <i>dipping</i> . E – Kit de coleta de amostras Clínica do Leite. F – Teteira de ordenha.	42
Figura 4. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A– Teteira de ordenha. B – Sala de ordenha. C - Mão de obra. D - Equipamento de ordenha E – Entrada das búfalas nas instalações.	43
Figura 5. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A–Teste da caneca de fundo preto e pré- <i>dipping</i> . B – Equipamento de ordenha. C – Sala de ordenha. D - Teteira de ordenha. E – Mão de obra.....	44
Figura 6. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A – Equipamento de ordenha. B – Sala de ordenha. C – Glândula mamaria. D – Bezerros indo a mamar. E – Presença de cachorros na sala de ordenha.	45
Figura 7. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos de aproximadamente 894pb, relativo ao gene de <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 29213 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.	52
Figura 8. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos de aproximadamente 130pb, relativo ao gene do <i>Staphylococcus epidermis</i> , obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 12228 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6)	

Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.53

Figura 9. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de aproximadamente 468pb, relativo ao gene do *Escherichia coli*, obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 43895 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.54

Figura 10. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação dos fragmentos aproximadamente de 317 e 572 pb, relativo ao gene do *Streptococcus dygalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, respectivamente. Obtidos através das técnicas de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Amostra propriedade A (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade B (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade C (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade D (9) Amostra propriedade D.55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição do rebanho mundial de búfalos por continente em 2011.....	19
Tabela 2. Principais agentes causadores da mastite em búfalas.....	24
Tabela 3. Contagem de Células Somáticas em leite de búfalas.	28
Tabela 4. Sequência dos primers utilizados na confirmação dos microrganismos mais frequentes no isolados no isolamento de mastite subclínica em búfalas.	38
Tabela 5. Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas no Estado de São Paulo.	41
Tabela 6. Contagem de Células somáticas e contagem padrão em placa em amostras de leite das búfalas.	46
Tabela 7. Análise microbiológica e bioquímica em amostras de leite de búfalas.....	49
Tabela 8. Perfil ao teste de sensibilidade <i>in vitro</i> das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermis</i> isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.	57
Tabela 9. Perfil ao teste de sensibilidade <i>in vitro</i> das bactérias <i>Streptococcus</i> spp. isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.	58
Tabela 10. Perfil ao teste de sensibilidade <i>in vitro</i> das bactérias <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
BHI	Infusão cérebro-coração
pb	Pares de base
CCS	Contagem de células somáticas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Test
CPP	Contagem padrão em placa
Cel/mL	Células por mililitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
%	porcentagem
/	divisão
-	negativo
+	positivo
°C	grau Celsius
>	maior que
<	menor que
μL	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A Bubalinocultura	18
2.1.1 População mundial de búfalos	18
2.1.2 População de búfalos no Brasil	19
2.1.3 Produção do leite de búfala.....	20
2.1.4 Características físico-químicas do leite de búfala	20
2.1.5 Características microbiológicas do leite de búfala	21
2.2 Mastites em Búfalos	23
2.2.1 Imunologia da glândula mamária	25
2.2.2 Testes diagnósticos.....	26
2.2.3 Antibiograma	30
2.2.4 Efeito da mastite na indústria alimentícia.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Amostragem.....	33
4.2 Análises laboratoriais	34
4.2.2 Avaliação microbiológica e contagem bacteriana total e colônias	35
4.3 Caracterização molecular das bactérias isoladas.....	37
4.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana.....	39
4.5 Análise dos dados.....	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Caracterização das propriedades	40
5.2 Contagem padrão em placa (CPP) e Contagem de células somáticas (CCS)	46
5.3 Análise Microbiológico e bioquímica das bactérias isoladas	48
5.4 Identificação das linhages isoladas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	51
52	
5.5 Perfis de sensibilidade a antimicrobianos <i>in vitro</i>	55
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite de búfalas retrata uma atividade de imensurável importância em muitos países do mundo; dos quais os países asiáticos e a Itália se destacam. No Brasil, não obstante a sua recente introdução, e com o rebanho ainda em formação, o búfalo tem despertado o interesse crescente dos criadores e dos órgãos de pesquisa como nova alternativa para a pecuária leiteira (JORGE *et al.*, 2002). O Brasil possui ao redor de 1,3 milhão de cabeças de búfalos, registrando um crescimento do rebanho de 7,8% no período 2010-2011 (IBGE, 2011). O Estado de São Paulo, com 69,1 mil cabeças, é o responsável pelo quinto maior rebanho bubalino do país (KAPRONEZAI *et al.*, 2005).

Os bubalinocultores brasileiros estão interessados em aumentar a quantidade e qualidade de búfalos com foco na produção de leite, o que tem promovido aumento na produção de búfalos em diferentes regiões do país. Os produtos lácteos de leite bubalino são importantes opções disponíveis nas prateleiras dos supermercados para consumidores que estão à procura de um produto diferenciado, não só pelo seu sabor especial e característico, mas também por um produto de alta qualidade e segurança alimentar (ARAUJO *et al.*, 2012).

O leite de búfala tem um grande potencial de produção comercial por conter características físico-químicas particulares, como, por exemplo, os elevados teores de sólidos totais, gordura e caseína (41,1; 88,5 e 47,7% superiores, respectivamente, ao do leite de vaca) (JORGE *et al.*, 2002), o que representa para a indústria de lácteos um aproveitamento superior, chegando comparativamente a sobrepujar o rendimento do leite bovino em mais de 40-50%. Esta característica é derivada do elevado teor de extrato seco total, além de características físicas como densidade, coloração branca opaca e disposição coloidal dos constituintes do leite (ANDRADE *et al.*, 2011).

Sua industrialização tem gerado produtos diferenciados, como mozzarella, provolone e ricota, entre outros, cuja remuneração tem-se mostrado superior à dos produtos oriundos do leite bovino (JORGE *et al.*, 2002). Contudo, há necessidade de estudos de novas alternativas para melhorar a qualidade e produção leiteira das búfalas (ANDRIGHETTO *et al.*, 2005).

No Brasil, falta uma legislação específica para determinar o padrão de qualidade do leite das búfalas, dificultando medidas de controle e fiscalização. Apenas no Estado de São Paulo, há

legislação para alguns parâmetros de qualidade do leite bubalino, como o teor de gordura (AMARAL *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009).

A mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária, devido a um processo predominantemente infeccioso, causada por muitos microrganismos, principalmente bactérias, podendo ter também envolvimento de fungos e leveduras (JORGE *et al.*, 2005; BALOCH *et al.*, 2011). O diagnóstico eficaz e preciso é de extrema importância para controle desta doença (VIANA *et al.*, 2010). No entanto, a ausência de alterações macroscópicas como secreções nos tecidos ou nos casos de mastite subclínica, que se torna impossível identificar os quartos mamários comprometidos, os métodos de diagnóstico de rotina incluem apenas exames físicos e de secreção, inspeção, palpação e teste do copo (BONINI PARDO *et al.*, 2007).

Na mastite podem ser utilizados testes diretos no diagnóstico que se baseiam na identificação do agente etiológico em amostras devidamente coletadas e analisadas em laboratórios apropriados para detecção da presença de microrganismos nas amostras de leite. Um sistema de controle efetivo compreende o conhecimento da interação do microrganismo com a glândula mamária num determinado ambiente junto ao sistema produtivo (MOTA, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2010).

Por falta de informações sobre a espécie bubalina, utilizam-se para o controle da mastite as mesmas técnicas de criação e manejo indicadas para os bovinos (CARVALHO *et al.*, 2007). Dessa forma, fica evidente a necessidade da realização de pesquisas visando obter conhecimento das reais características do leite de búfala criadas em diferentes regiões do país e do mundo, com soluções que possam ser adotadas como medidas de controle de mastites, evitando sérios prejuízos aos produtores e consumidores de produtos de leite de búfala.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Bubalinocultura

Os búfalos domésticos são animais pertencentes à espécie *Bubalus bubalis*, originários da região asiática, classificados dentro da família *Bovidae* e subfamília *Bovinae*. São animais rústicos com boa capacidade de adaptação a várias condições climáticas e geológicas, principalmente as tropicais (BASTIANETTO, 2009; VILELA & SANTINI, 2010).

A bubalinocultura é uma atividade recente no Brasil, embora este possua o maior rebanho da América do Sul, seguido pela Venezuela, Argentina e Colômbia (VALLE, 1999 *apud* ANDRIGHETTO *et al.*, 2005).

No Brasil, os búfalos chegaram no século XIX, originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe, e foram instalados inicialmente na região norte, na ilha de Marajó (Estado do Pará), e depois se expandiram por toda a região e território nacional. Estes animais foram introduzidos inicialmente como apenas interesse nos pecuaristas pelo exotismo dessa espécie. Anos mais tarde foram observadas boas características produtivas do rebanho bubalino no Brasil, tais como adaptação e tolerância ambiental, elevada fertilidade, baixo índice de mortalidade dos búfalos, entre outras (BERNANDES *et al.*, 2007; BASTIANETTO *et al.*, 2009).

No Brasil, são registrados animais de quatro raças oficialmente reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Mediterrâneo, Carabao, Jafarabadi e Murrah. A primeira é de origem italiana e as outras de origem asiática (VILELA e SANTINI, 2010).

No estado de São Paulo, o ingresso ocorreu em 1920, após a importação de 20 fêmeas e um macho de raça mediterrânea pelo conde Francisco Matarazzo. Esses animais foram trazidos para uma de suas propriedades no município de Santa Rosa do Viterbo, próximo a Ribeirão Preto (SP). Hoje, o Brasil é exportador da espécie para toda a América Latina (ABCB, 2010).

2.1.1 População mundial de búfalos

A população mundial de búfalos gira em torno de 200 milhões de animais, com distribuição geográfica em todo mundo, porém com cerca de 97% localizada na Ásia (FAO, 2014) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do rebanho mundial de búfalos por continente em 2011.

Continente	Rebanho (Cabeças)	Total %
América	1.283.860	0,66
África	3.800.025	1,95
Ásia	189.792.540	97,2
União Europeia	380.527	0,19
Oceania	210	0,0
Total	195.257.162	100

Fonte: Adaptado da FAO (2014).

No continente asiático, destacam-se a participação expressiva de países como a Índia, Paquistão e China. Ressalta-se que estes são países em desenvolvimento, juntamente com o Brasil, onde a bubalinocultura surge como uma atividade promissora, embora ainda com uso de pouca tecnologia. Na África, o Egito possui o maior rebanho de búfalos, com 3.8 milhões de cabeças. Já na Europa, a Itália destaca-se com 365 mil cabeças (FAO, 2014).

2.1.2 População de búfalos no Brasil

O Brasil possui o maior rebanho de búfalos da América (LAZZARI, 2012; FAO, 2014) com cerca de 1.277.200 cabeças (2011) segundo dados da FAO (2014). A bubalinocultura está presente em todas as regiões do Brasil, entretanto de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a maior representatividade do rebanho brasileiro localiza-se nas Regiões Norte e Nordeste do país, particularmente nos Estados do Pará (38,0%), Amapá (18,4%) e Maranhão (6,5%).

Houve aumento na população bubalina brasileira de 2010 para 2011 de 7,8%, com destaques para os crescimentos nas Regiões Norte (8,9%), Sudeste (8,8%) e Centro-Oeste (22,6%), e reduções de 4,3%, registrados na Região do Nordeste e 4,2%, na Região Sul (Figura 1).

Observa-se, portanto, que a criação de bubalinos vem apresentando tendência de crescimento no Brasil demonstrando um grande potencial produtivo para leite e carne juntamente com as pecuárias de leite e corte contribuindo para o crescimento do agronegócio brasileiro.

Búfalos no Brasil 2010/2011

Figura 1. Representação gráfica do efetivo de bubalinos segundo as Grandes Regiões do Brasil 2010-2011.

Fonte: Adaptado IBGE, Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2010-2011 (2011).

2.1.3 Produção do leite de búfala

A produção de leite de búfala no mundo vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, passando de um total de 66.511.552,20 toneladas em 2000 para 93.016.858,60 toneladas em 2011. Isto representou aumento total ao redor de 40% no período de 11 anos (FAO, 2014).

Na industrialização do leite de búfala no Brasil, existem cerca de 150 indústrias produtoras de derivados desta matéria-prima, produzindo aproximadamente 18,5 mil toneladas de derivados, por meio de 45 milhões de litros de leite de búfala, os quais geraram um faturamento bruto anual, em 2011 da ordem de US\$ 17 milhões aos criadores e cerca de US\$ 55 milhões aos laticínios.

É importante ressaltar que falta uma legislação específica federal para determinar a identificação da espécie produtora de leite e da qualidade do leite de búfalas (AMARAL, 2005).

2.1.4 Características físico-químicas do leite de búfala

O leite de búfala apresenta elevado valor nutricional, altos teores de gorduras, proteínas e minerais (aproximadamente 25% de cálcio), podendo ser utilizado tanto para o consumo *in natura* ou como matéria-prima para elaboração de produtos lácteos, que podem variar conforme a cultura de cada região (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

O leite de búfala possui acentuadas diferenças físico-químicas, em comparação ao leite de vaca com grandes micelas de caseína, proporcionando rápida coagulação no processamento; menos água e, conseqüentemente, produtos mais firmes; sua gordura é constituída de glóbulos maiores e de coloração clara; os ácidos graxos capríco, caprílico e cáprico são encontrados em menor quantidade e, quando liberados nos derivados lácteos, contribuem para o sabor e aroma característicos (FALEIRO, 2013). Além disso, a hidrólise durante a maturação dos seus derivados é mais lenta, no que se refere às atividades lipolíticas e proteolíticas (ROCHA, 2008).

2.1.5 Características microbiológicas do leite de búfala

Há relativamente poucos estudos sobre as características microbiológicas do leite de búfalas. Algumas peculiaridades do manejo e comportamento das búfalas, entre outros fatores, podem contribuir para aumentar significativamente a carga microbiana inicial do leite cru, diminuindo assim a validade do produto e seu emprego pela indústria (CUNHA NETO, 2003).

Os búfalos possuem termorregulação cutânea diferenciada, como forte concentração de melanina na pele pequena quantidade de glândulas sudoríparas, baixa densidade de pêlos e pele escura que os tornam sensíveis à radiação solar (DA SILVA, 2010). Durante os períodos quentes do dia, os animais tendem a procurar poças de água ou lama para evitar o estresse térmico e usualmente pastejam apenas nas horas de menor temperatura (ABLAS *et al.*, 2007). O hábito de imergir em coleções de água gera uma grande dificuldade para a obtenção higiênica do leite e compromete a qualidade microbiológica do leite de búfala que está intimamente relacionado com os hábitos do animal e ao manejo de ordenha (TEIXERA *et al.*, 2005).

Outra peculiaridade do comportamento das búfalas é o hábito de deitar na lama após a ordenha, e por ainda estar com os esfíncteres dos tetos abertos, tornam-se mais susceptíveis a contrair mastite de origem ambiental. Este problema pode ser resolvido fornecendo a essas búfalas uma alimentação, por exemplo, composta por volumoso palatável após a ordenha. Essa prática faz com que as búfalas permaneçam de pé o tempo necessário (em média uma hora) para que os esfíncteres dos tetos voltem ao estado normal (GUSMÃO & JORGE, 2008). Diversos autores consideram que os hábitos comportamentais das búfalas dificultam a higienização do úbere e, conseqüentemente, favoreçam a contaminação inicial do leite devido ao acúmulo de sujidades na glândula mamária.

Dois parâmetros muito importantes para medir a qualidade microbiológica do leite em bovinos e em bubalinos são a Contagem Padrão em Placa (CPP) e Contagem de Células Somáticas (CCS). A CPP é expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). Segundo a Instrução Normativa n° 62 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para leite cru bovino, o limite máximo do CPPT de rebanho (amostra de tanques) seria de $6,0 \times 10^5$ cel/mL, valores acima deste limite indicaria falta de higiene na fazenda. Contudo este valor será reduzido para $3,0 \times 10^5$ (de 2014 até 2016 nas regiões S, SE, CO e a partir de 2017 nas regiões N e NE) e para $1,0 \times 10^5$ (a partir de 2016 nas regiões S, SE, CO e a partir de 2015 a 2017 nas regiões N e NE) (BRASIL, 2011a). Segundo Fonseca & Santos (2000), a CPP do leite é dependente da concentração bacteriana inicial e da taxa de multiplicação dos microrganismos, estando estas variáveis relacionadas com higiene de ordenha, saúde da glândula mamária, limpeza dos utensílios e equipamentos e qualidade da água.

Figueiredo et al. (2010), avaliando a qualidade microbiológica do leite *in natura* proveniente de rebanhos bubalinos do estado do Pará, encontraram valores médios de $3,2 \times 10^4$ UFC/mL para bactérias mesófilas aeróbicas provenientes do leite de cada búfala ordenhada. Resultados obtidos por Vianni et al. (2000) observaram valores médios de $7,6 \times 10^4$ UFC/mL, 8×10^4 UFC/mL e $2,2 \times 10^5$ UFC/mL, para bactérias mesófilas aeróbicas provenientes de quartos mamários individuais, do leite de cada búfala ordenhada (leite individual) e do leite de todos os animais (leite de mistura), respectivamente. Tais resultados permitiram concluir que a qualidade do leite *in natura* dos rebanhos estudados estava inferior ao padrão exigido na normativa 62 de 2011 do MAPA para leite de bovinos ($1,0 \times 10^4$ UFC/mL), devido ao elevado número de bactérias deterioradoras, evidenciando a falta de adoção de medidas higiênico-sanitárias antes, durante ou após a ordenha.

Altos níveis de bactérias têm efeito negativo sobre a qualidade do leite, especialmente no que concerne ao sabor, à vida de prateleira e à segurança alimentar do produto disponibilizado ao consumidor. As principais fontes de contaminação do leite estão relacionadas às práticas de ordenha, armazenamento e transporte, visto que o resfriamento, a presença de resíduos de antimicrobianos ou produtos químicos e a qualidade microbiológica da água podem influenciar de forma significativa na contagem bacteriana total (FONSECA & SANTOS, 2000). Apesar destes fatos, não existem atualmente, no Brasil, regulamentos que definam limites máximos para a contagem de microrganismo no leite de búfala fornecido aos laticínios.

2.2 Mastites em Búfalos

A mastite é a inflamação da glândula mamária que ocorre como resposta, na maioria das vezes, a uma infecção causada por microrganismos (MOTA, 2008), que ocasiona inflamação do parênquima da glândula mamária independente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas e químicas do leite (BENEDETTE *et al.*, 2008), gerando prejuízos econômicos, ocasionados pela redução da produção e alteração dos principais componentes do leite (SILVA & NOGUEIRA, 2010). As perdas anuais são estimadas em cerca de US\$ 184 por animal (BALOCH *et al.*, 2011).

Esta doença determina consideráveis prejuízos à indústria de laticínios, relacionados às alterações na composição do leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento em sódio e cloro) com redução de sua qualidade. Além disso, o antibiótico usado para tratar mastite é uma preocupação importante para a indústria e para a saúde pública. A presença de resíduo de antibiótico no leite interfere com o processo de manufatura de muitos produtos lácteos (queijo e outros produtos fermentáveis). Sabores indesejáveis reduzem o valor dos produtos lácteos e a presença de antibióticos, mesmo sendo em níveis baixos, pode causar problemas de saúde nos consumidores (TOZZETTI *et al.*, 2008).

A mastite pode ser classificada de acordo com a manifestação da infecção em clínica, caracterizada por alterações físicas, químicas e geralmente bacteriológicas no leite, tal como a presença de sangue, água, pus contendo coágulos e restos celulares e alterações patológicas no tecido glandular, ou subclínica, com ausência de alterações visíveis no úbere ou no leite. Entre os métodos utilizados no diagnóstico da mastite destacam-se o teste da caneca (“prova de Tamis”), o California Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT) ou viscosímetro, a condutividade elétrica (EC), a contagem microscópica direta e contagem eletrônica (CCS) e a cultura microbiológica (meio de cultura) (FAGIOLO & LAI, 2007; SANTOS & FONSECA, 2007). No Brasil, Cunha *et al.* (2006) investigaram rebanho com 128 búfalas em lactação, sendo que 5,47% apresentaram mastite clínica, com 2,73% quartos mamários afetados. Já ao Califórnia Mastite Test (CMT), foram detectados 41,41% animais com mastite subclínica, totalizando 20,12% de quartos afetados com graus variados.

Desta forma, em búfalos, assim como em bovinos, a mastite subclínica pode ocorrer em grandes proporções no rebanho, porém o índice em bubalinos tem sido identificado como inferior ao dos bovinos, mesmo assim, estes índices merecem atenção.

O conhecimento da imunidade da glândula mamária das búfalas, das características do processo inflamatório e dos métodos utilizados para o diagnóstico dessa enfermidade, se fundamenta, em grande parte, nos conhecimentos existentes em outras espécies animais. Existe a necessidade de se conhecer as particularidades da espécie bubalina, avaliando semelhanças e diferenças do processo inflamatório da glândula mamária em relação à espécie bovina (LAZZARI, 2012).

No entanto, em comparação com os bovinos, búfalos possuem algumas características que podem contribuir para um maior risco de mastite, tais como úbere e tetos mais pendentes e mais longos (FAGIOLO & LAI, 2007). Por outro lado, as búfalas possuem o canal do teto longo e estreito, o que pode dificultar a invasão de microrganismos (MORONI *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores isolaram e identificaram os principais microrganismos causadores da mastite em búfalas. As espécies mais comum nesses trabalhos são o *Staphylococcus* spp., o *Streptococcus* spp. e a *Escherichia coli*. (Tabela 2).

Tabela 2. Principais agentes causadores da mastite em búfalas.

AUTORES	AGENTES CAUSADORES DA MASTITE EM BÚFALAS
Chander & Baxi (1975)	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> . e <i>Corynebacterium</i> spp.
Paranjape & Dias (1986)	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., e <i>Escherichia coli</i> .
Muhammad <i>et al.</i> , (1997)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Staphylococcus hyicus</i>
Langoni <i>et al.</i> , (2001)	<i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Bacillus</i> spp.
Oliveira <i>et al.</i> , (2004)	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa, <i>Streptococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.
Kapronezai <i>et al.</i> , (2005)	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., e <i>Streptococcus</i> spp.
Cunha <i>et al.</i> , (2006)	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., e <i>Enterobacter</i> spp.
Dhakai <i>et al.</i> , (2007)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus albus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Dhakal <i>et al.</i> , (2008)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus albus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>
Kumar (2009)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>S. Ubris</i>
Baloch <i>et al.</i> , (2011)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> e <i>Citrobacter</i>
Medeiros <i>et al.</i> , (2011)	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Corynebacterium</i> spp.
Chavoshi & Husaini (2012)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>
Nogueira <i>et al.</i> , (2012)	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.2.1 Imunologia da glândula mamária

A glândula mamária é protegida por grande variedade de mecanismos de defesa, os quais podem ser separados em duas categorias: imunidade inata (ou inespecífica) e imunidade adquirida (específica). A imunidade inata é a defesa predominante durante as fases iniciais da infecção. As respostas inespecíficas estão presentes ou são ativadas no local rapidamente por numerosos estímulos provocados pela infecção. As respostas não específicas ou inatas da glândula mamária são mediadas por uma barreira física no final do teto, macrófagos, neutrófilos e determinados fatores solúveis. Por outro lado, o sistema imune adquirido ou específico reconhece fatores específicos de um agente patogênico e favorece uma eliminação seletiva. O reconhecimento dos fatores patogênicos é mediado por moléculas como os anticorpos, macrófagos e várias populações linfóides (SORDILLO *et al.*, 1997).

Devido à "memória" de determinados linfócitos, a resposta imune específica pode ser potencializada pela exposição repetida a um agente patogênico (SORDILLO *et al.*, 1997). Acredita-se que as búfalas, pelo fato de terem seus esfíncteres mais rígidos, serem animais rústicos e provavelmente por possuírem um sistema imunológico mais eficiente, são mais resistentes à mastite que as vacas bovinas. Essa linha de pensamento não condiz com a realidade. Baseia-se em rebanhos de búfalas que não são ordenhadas ou de baixa produção leiteira. Búfalas de alta produção leiteira são tão susceptíveis à mastite quanto às vacas bovinas leiteiras, porém a

tem-se observado que essa doença é mais difícil de debelar em búfalas que em vacas bovinas (GUSMÃO & JORGE, 2008).

2.2.2 Testes diagnósticos

O diagnóstico da mastite é realizado através da utilização de testes diretos e indiretos (MOTA, 2008). Para a mastite clínica, o teste direto é realizado de forma observacional dos sinais da inflamação e com o uso da caneca telada de fundo escuro. Para diagnosticar a mastite subclínica são realizados exames microbiológicos, métodos indiretos e a CCS do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou mesmo do rebanho (RIBEIRO *et al.*, 2003).

a) Contagem de células somáticas

O termo células somáticas abrange diferentes elementos celulares normalmente presentes no leite e inclui células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação (ANDRADE *et al.*, 2001; VOLTOLINI *et al.*, 2001). É um critério mundialmente utilizado por indústrias, produtores e entidades governamentais para o monitoramento da mastite em nível individual, de rebanhos e para avaliação da qualidade, higiene e controle da mastite (VEIGA, 2006a e 2006b; OGALA *et al.*, 2007).

Normalmente os leucócitos correspondem de 75% a 98% do total de células somáticas e o restante é oriundo das células epiteliais provenientes da descamação que ocorre no tecido de revestimento da glândula mamária (FONSECA & SANTOS, 2000). No entanto, é possível ocorrer predominância de células epiteliais (48,42%), seguidas pelos linfócitos (29,28%), neutrófilos (20,98%) e monócitos (1,62%) em leites de búfalas sadias, enquanto que no leite de búfalas com mastite encontram-se maior ocorrência de neutrófilos (67,33%), seguidos por linfócitos (20,40%), células epiteliais (10,80%) e monócitos (2,10%) (DHAKAL *et al.*, 1992). Carvalho *et al.* (2007) relataram que o padrão de contagem de células somáticas (CCS) para bubalinos é diferente do normalmente encontrado em bovinos. Os baixos valores de CCS não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária. Os parâmetros de CCS utilizados para bovinos podem não ser adequados para monitoramento de mastite em rebanhos de bubalinos.

Para búfalas, no Brasil, ainda não existe uma legislação que regulamente o padrão de CCS e o uso de parâmetros utilizados para bovinos de CCS tem-se mostrado inadequado, pois os valores das contagens são significativamente menores em bubalinos do que nos bovinos (AMARAL, 2005). A glândula mamária bovina sadia apresenta uma CCS entre 50 e 200 mil cel/mL de leite de vaca (BRITO *et al.*, 2007). Desta forma, na tabela 3, tem-se um resumo de pesquisas realizadas com búfalas; observando os resultados, nota-se uma diversidade de valores para indicar se o animal está com mastite ou não. Para os búfalos, um valor superior a 400.000 células/mL, foi sugerido por Piccini *et al.* (2006). Da mesma forma na Europa, segundo The European Union Directives (92/46CEE e 94/71 CEE), foi estipulado o limite máximo de 400.000 células mL⁻¹ para o leite *in natura* recém produzido. Kapronezai (2004) relatou valores de mediana para CCS de 8.500/mL, 10.350/mL, 9.600/mL quando foram isolados *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., respectivamente. Dhakal, (2006) realizou um estudo para investigar a contagem normal de células somáticas (CCS) e definir mastite subclínica em búfalos da raça Murrah. Os dados foram coletados a partir de 60 búfalas clinicamente normais de cinco fazendas, a mastite subclínica foi diagnosticada com base em amostras com CCS >200 000 cel/mL com culturas bacterianas positivas. Mastite subclínica foi encontrada em 21,7% búfalos.

Em estudo, de Dhakal *et al.* (2008) avaliaram 216 quartos de 54 bubalinos mestiços da raça Murrah, sendo a média de CCS do leite de 171×10^3 cel/mL para animais sem mastite, 799×10^3 cel/mL para animais com mastite subclínica e 6.039×10^3 cel/mL para animais com mastite clínica. Mendoza-Sanchez *et al.* (2009) encontraram diferenças significativas de CCS entre o estágio da lactação, sendo que os maiores valores ocorreram no primeiro mês de lactação (126.131 cel/mL), e a partir do sexto mês, as maiores médias foram registradas no sétimo mês de lactação (994.290 cel/mL). Já na pesquisa de Medeiros *et al.* (2011), observou-se que as amostras positivas no exame microbiológico apresentaram CCS entre 280.000 a 401.000 cel/mL com mediana de 328.000 cel/mL. Conclui-se que valores de CCS acima de 200.000 cel/mL são um indicativo de infecção da glândula mamária em búfalas.

Na Normativa N°62 DE 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para bovinos, foi determinado o limite máximo de CCS no período de 01.1.2012 até 30.6.2014 de $4,8 \times 10^5$ cel/mL, sendo que o valor será reduzido para $4,0 \times 10^5$ cel/mL, a partir de

01.7.2014 até 30.6.2016, e a partir de 01.7.2016 está previsto o valor de $3,6 \times 10^5$ cel/mL como limite. Já para leite de búfala não existe qualquer legislação que estabelece padrões para a CCS.

Além disso, Normativa Nº62 DE 2011 do MAPA determina os padrões físico-químicos e microbiológicos do leite bovino produzido no Brasil, sendo obrigatória a realização de pelo menos uma vez por mês a análise CCS no leite dos produtores rurais fornecedores de leite, para laticínios fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2011a).

Tabela 3. Contagem de Células Somáticas em leite de búfalas.

AUTORES	CCS DAS BÚFALAS (cel/mL)
Galiero & Morena (2000)	Sem Mastite - 50.000 a 100.000
Dhokal (2006)	Mastite Subclínica < 200.000
Dhokal, Neupane e Nagahata (2008)	Sem Mastite - 171.000.00 M. Subclínica- 799.000.00 M. Clínica - 6.039.000.00
Medeiros <i>et al.</i> , (2011)	Mastite < 280.000

b) Califórnia Mastite Teste (CMT)

O teste do CMT é um indicador sensível da presença de inflamação no úbere, apesar de não ser capaz de distinguir as possíveis causas da inflamação. Desenvolvido por Schalm & Noorlander (1957), tem sido rotineiramente usado para avaliar o conteúdo de leucócitos e células epiteliais, definidos como as células somáticas (SC), no leite de fêmeas bovinas. Ele é baseado na interação entre um surfactante aniônico e o DNA das células somáticas presentes na amostra de leite submetido à avaliação. A espessura do gel, produzido frequentemente, é pontuada como traço (negativo), 1 +, 2 +, 3 +, 4 + e 5 +. O score 1 indica uma reação completamente negativa e os de 2-5 indicam graus crescentes de resposta inflamatória do úbere, sendo normalmente considerados como indicativos de mastite subclínica. Dependendo da interpretação dos escores, o CMT pode produzir resultados falso-positivos ou falso-negativos (BRITO *et al.*, 1997). Em estudo realizado por Kapronezai, (2004) observou-se que a frequência de quartos negativos e com isolamento microbiológico foi maior do que a frequência de quartos positivos e com isolamento de microrganismos, indicando que há elevada frequência de portadores ou que o teste de CMT não é

um bom teste de triagem para mastite em bubalinos. Já Medeiros et al. (2011) em seu estudo conclui que o exame microbiológico do leite é o melhor método para diagnóstico da mastite subclínica em búfalas.

c) Teste da caneca (“prova de Tamis”)

Consiste em examinar os três ou quatro primeiros jatos de leite previamente à ordenha dos animais, contrastando-os com uma superfície de fundo preto, com a finalidade de observar presença de alterações no leite, tais como grumos ou coágulos, pus, secreção sanguinolenta ou leite aquoso, sendo usado para diagnosticar a mastite clínica, estimular a “descida” do leite e verificar a presença de uma maior concentração microbiana (COSTA, 2008).

d) Cultura bacteriológica

Costa et al. (1996), Brito & Brito (1998) e Brito et al. (2013) alertam que além de identificar os animais com mastite, seja ela clínica ou subclínica, é de suma importância realizar os testes microbiológicos periódicos para a identificação dos agentes causadores da mastite. Este é um teste de diagnóstico definitivo (FONSECA & SANTOS, 2000), pois isola e identifica o agente que está causando a mastite. Após a realização da classificação dos microrganismos através dos testes bioquímicos, deve ser realizada a avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos, pois além de mostrar o grau de susceptibilidade antimicrobiana, auxilia no controle ao estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo este controle estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático, estabulação e a introdução de ordenhadeira mecânica, fatores que atuam como forças seletivas sobre os patógenos causadores da mastite (MYLLYS *et al.*, 1994 *apud* COSTA, 2008).

O uso indevido de antibióticos aumenta a resistência, o que torna cada vez mais difícil o tratamento da mastite, devido à necessidade de descobrir novos compostos que sejam eficazes. A resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos vem aumentando significativamente, devido ao uso incorreto ou indiscriminado de antimicrobianos tanto em medicina humana, quanto animal (desrespeito ao período de carência, doses erradas, tratamentos com antibióticos inespecíficos para o agente causador da mastite e tratamento dos animais durante a lactação) BARBERIO et al. (2002).

2.2.3 Antibiograma

A identificação dos patógenos causantes de mastites e os resultados da resistência aos antibióticos das bactérias isoladas são requisitos importantes para a implementação de um controle efetivo da mastite em búfalos (DHAKAL *et al.*, 2007). O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou susceptibilidade de uma bactéria específica aos antimicrobianos (antibióticos ou quimioterápicos) (SILVA *et al.*, 2008). A interpretação da susceptibilidade se baseia na medida do halo de inibição do crescimento bacteriano formado ao redor do disco. É importante notar que microrganismos que apresentarem resistência *in vitro* também serão resistentes *in vivo*. Por outro lado, microrganismos apresentando sensibilidade *in vitro* podem ser resistentes *in vivo* (BRASIL, 2011b).

Como exemplo de resistência a antimicrobianos, pode-se citar que estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de vacas com mastite em diferentes partes do mundo, como Espanha, Inglaterra, Índia e até do Brasil, mostraram-se resistentes à penicilina em diferentes porcentagens (ARAUJO, 1998).

2.2.4 Efeito da mastite na indústria alimentícia

Altas CCS ocasionam diversas mudanças na composição do leite (gordura, proteína e lactose), afetando sua qualidade, pois alteram a permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e reduzem a secreção dos componentes do leite sintetizados na glândula mamária pela ação direta dos patógenos ou de enzimas sobre os componentes secretados no interior da glândula (MACHADO *et al.*, 2000).

Sabe-se que a alta CCS no leite não consiste em fator de risco para a saúde do consumidor, uma vez que os patógenos são destruídos no processo de pasteurização. Porém, as enzimas microbianas não são destruídas neste processo e permanecem nos produtos lácteos, diminuindo o seu tempo de vida útil, segundo Philpot & Nickerson (1991). Também se podem apresentar mudanças de paladar e valores nutricionais igualmente comprometidos (SILVA *et al.*, 2008; DE JESUS *et al.*, 2010). Na indústria de derivados lácteos, há problemas como aumento do tempo de coagulação do leite, diminuição da firmeza do coágulo, maior perda de componentes do leite para o soro, menor rendimento de fabricação, defeitos de textura e alteração das características organolépticas (MUNRO *et al.*, 1984).

O leite com alta contagem microbiológica altera a coagulação da massa e consequentemente a textura do queijo. Essa alteração na formação do queijo se reflete diretamente no rendimento da produção, que apresentará onerosa diminuição (TEIXERA *et al.*, 2005). Para o produtor, altas CCS significam menor retorno econômico, em decorrência da redução na produção, dos gastos com medicamentos e também das penalidades aplicadas aos laticínios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolamento e caracterização fenotípica e molecular dos principais microrganismos causadores de mastites subclínicas em búfalas (*Bubalus bubalis*) em granjas leiteiras da região central do Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a contagem de células somáticas (CCS) como teste indireto de diagnóstico de mastite subclínica em búfalas;
- Avaliar o número de UFC/mL dos microrganismos isolados das amostras de leite de búfalas;
- Caracterizar morfológica e bioquimicamente os principais microrganismos isolados do leite de búfala;
- Identificar os principais microrganismos causadores de mastite subclínica pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*);
- Definir um perfil de sensibilidade dos principais microrganismos isolados frente a 18 agentes antimicrobianos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de quatro propriedades leiteiras localizadas na região Central do Estado de São Paulo. Os locais de estudo foram caracterizados por altitude média de 800 m em relação ao nível do mar, temperatura média anual de 20,2°C e precipitação média anual de 1.464 mm. Todas as propriedades leiteiras possuem laticínio para elaboração de subprodutos como queijo tipo mozzarella (bola, nozinho, manta, palito, barra, tranca), ricota fresca e manteiga. Por se tratarem de propriedades comerciais com potenciais implicações econômicas envolvidas, as quatro propriedades serão descritas e identificadas como: A, B, C e D.

Com a finalidade de levantamento das principais causas possíveis de mastite subclínica em bubalinos, inicialmente, foram avaliados os seguintes itens de cada propriedade: local de ordenha, higiene das instalações em geral, higiene da sala de ordenha, higiene dos equipamentos de armazenamento do leite, higiene dos ordenadores, das edificações onde os animais permanecem (estabulados e/ou pasto), além das principais características de manejo, práticas de ordenha, medidas de prevenção de mastite, rotina de tratamentos e medicamentos habitualmente utilizados (Anexo 1). Informações individuais dos animais foram cuidadosamente registradas para posterior análise dos resultados (Anexo 2 e 3).

4.1 Amostragem

Foram avaliadas fêmeas bubalinas primíparas e pluríparas de diferentes raças e graus de sangue, em diferentes estágios de lactação. Foram coletadas amostras de leite de cinco búfalas de cada rebanho procedentes das quatro propriedades rurais de bubalinocultura (A, B, C e D), totalizando 20 amostras, durante o período de janeiro a junho de 2013. Nenhum dos animais avaliados nesse estudo foi submetido a tratamento medicamentoso nos 30 dias anteriores à coleta de material. Com a finalidade de se coletar amostras de possíveis búfalas com mastites subclínicas, foram avaliadas as CCS de todas as búfalas do rebanho no mês anterior às coletas através de arquivo do controle sanitário realizado pela propriedade. Assim, foram selecionadas para amostragens somente os animais que apresentaram CCS maior que 200.000 cel/mL (DHAKAL, 2006), com exceção da propriedade D em que foram colhidas amostras de animais que apresentaram score positivo (4 + e 5 +) no teste CMT. A glândula mamária das búfalas foi avaliada por inspeção e palpação, examinando-se a textura do parênquima, tetos e estruturas

internas (*ductos papilaris*, *sinus papilaris* e *sinus latifer*), após o exame físico da glândula mamária.

A glândula mamária foi higienizada retirando-se as sujidades depositadas sob a pele da glândula e dos tetos, tendo-se o cuidado de utilizar uma toalha de papel descartável para cada quarto mamário. A seguir, era realizada a antisepsia de cada teto, utilizando-se uma solução de álcool iodado a 10%, principalmente no óstio dos ductos papilaris e são descartados os primeiros jatos de leite. As amostras foram colhidas individualmente por animal, representando o leite dos quatro tetos de cada búfala leiteira.

Duas coletas de amostras de leite de 50 mL foram realizadas em frascos esterilizados, após homogeneização do leite no equipamento de ordenha. As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo reciclável até o Laboratório de Higiene Zootécnica do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo (ZMV/FZEA/USP). As amostras não sofreram congelamento, sendo analisadas imediatamente após a chegada ao laboratório, para não haver interferência nos resultados das análises.

4.2 Análises laboratoriais

4.2.1 Contagem de células somáticas (CCS)

A primeira amostra de 50 mL de leite foi coletada em tubos plásticos estéreis contendo conservante Bronopol (Microtabs®) é utilizado na forma de pastilhas contendo 8 mg de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3propanediol) e 0,3 mg de natamicina (D&F CONTROL SYSTEMS, 2009) utilizado na conservação das amostras para o contagem de células somáticas. Imediatamente após ser transferida para o frasco, foi homogeneizada com o conservante para garantir uma adequada conservação. A mistura foi realizada por movimentos lentos de inversão do frasco por 25 vezes. Essa operação foi repetida após alguns minutos para garantir a dissolução completa das pastilhas de conservante. Após a amostragem, cada amostra foi devidamente identificada com informações sobre o local, nome ou número de identificação do animal; data e hora da coleta.

Após a identificação, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável a uma temperatura de aproximadamente 5°C e foram encaminhadas ao Laboratório da Clínica do Leite, Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de

Queiroz” (ESALQ-USP), em Piracicaba, SP. Essa análise foi realizada dentro de 4 horas do momento da coleta através do equipamento Somacount 300® (Bentley Instruments, 1995).

4.2.2 Avaliação microbiológica e contagem bacteriana total e colônias

A segunda amostra foi também coletada em tubos de plástico estéreis, identificadas e transportadas ao laboratório sob condições monitoradas de refrigeração, e processadas no menor tempo possível, nunca excedendo um período de 6 horas a partir da coleta. As amostras de leite de búfala foram inicialmente diluídas em solução estéril de água peptonada a 0,1% (p/v); a partir de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), foi colhida uma alíquota de 0.1 mL, sendo inoculadas em *Agar Brain Heart Infusion* - BHI (Difco®, BD, EUA), com auxílio de uma alça de Drigalsky.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em aerobiose por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem padrão em placa (UFC/mL). Destas, foram repicadas dez colônias com características diferentes por animal e semeadas por esgotamento para o isolamento das colônias em diferentes meios de cultura (Figura 2). As colônias puras das respectivas placas foram identificadas com base em coloração de Gram; aspectos morfológicos e características macroscópicas; com os resultados iniciais obtidos foram feitas as provas bioquímicas.

Para a classificação dos *Staphylococcus* spp. foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de catalase em lâmina, teste de oxidase em papel de filtro, crescimento em ágar sal manitol, teste de coagulase em tubo e teste de aglutinação com partículas de látex.

Para a classificação das bactérias gram negativas, oxidase negativas, foi utilizado o sistema de identificação Bactray® I e II da Laborclin, no primeiro foram analisadas as seguintes provas bioquímicas: hidrólise da β -galactosidase (ONPG) e da arginina (ADH); descarboxilação da lisina (LDC) e da ornitina (ODC); produção de ácido sulfídrico (H_2S), indol (IND) e urease (URE); utilização da glicose e produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina (PD) e utilização do citrato como única fonte de carbono (CIT); além de 1,0 mL para o conjunto de análise Bactray® II, que é considerado complementar ao Bactray® I, foram analisadas as ovas de: utilização do malonato (MAL), rhamnose (RHA), adonitol (ADO), salicina (SAL), arabinose (ARA), inositol (INO), sorbitol (SOR) sacarose (SAC), manitol (MAN) e rafinose (RAF).

Figura 2. Fluxograma da metodologia usada para o isolamento e caracterização bioquímica dos microrganismos.

A classificação das bactérias gram negativas oxidase positivas foi realizada com o sistema Bactray® I, II e III da Laborclin. As recomendações para o Bactray® I e II são válidas para este, exceto a selagem das provas bioquímicas, controle de dehidrolase (CTL), (ARG) e (URE), onde se colocam três gotas de óleo mineral para cada reação. No sistema Bactray® III foram realizadas provas bioquímicas de cetrimide (CET), acetamida (ACE), malonato (MAL), citrato (CIT), maltose (MAL), esculina (ESC), controle de dehidrolase (CTL), arginina ADH, uréia (URE) e indol (IND). O microrganismo *Bacillus* spp. foi caracterizado utilizando crescimento em ágar nutriente com colônias de formato arredondado, lisas e de bordo irregular com consistência

cremosa na placa, coloração de gram e forma característica de bastonete, prova da catalase e oxidase. Para a identificação de *Corynebacterium* spp., as colônias foram visualizadas em microscopia ótica (1000X) em forma de clava, que tendem a formar arranjos em paliçadas e/ou letras chinesas, teste de catalase e mobilidade. Para a caracterização do gênero *Streptococcus* spp. foi utilizado crescimento em ágar sangue (α hemolíticos, β hemolíticos e γ hemolíticos), visualização no microscópio das colônias em forma cocóide em colar, prova da catalase e oxidase.

4.3 Caracterização molecular das bactérias isoladas

4.3.1 Extração de DNA

Amostras de DNA foram extraídas de culturas isoladas, incubadas por 18 horas em Ágar BHI (Difco[®], BD, EUA) a 37°C. O DNA foi extraído por lise térmica de colônias dessas culturas transferidas para microtubos com 1 mL de caldo BHI e incubados a 37°C sob agitação por 24 horas. Depois o microtubo foi centrifugado a 10000xg por 10 min e seguidamente foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 100 μ L de água MilliQ, homogeneizados e incubados a 95°C, por 10 min. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12000xg por 2 min, em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante utilizado como substrato para as reações de PCR (FANG & HEDIN, 2003).

4.3.2 Primers

Foram utilizados 10 pares de primers (Tabela 4) descritos por Shome et al. (2011) para realização da PCR, com amplificação de produtos genômicos de espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* (genes rRNA 23S, *sodA*, *rdr* e *gap*) e *Streptococcus* (genes rRNA 16S, *cpn60*, *phoA*), além da espécie *Escherichia coli* (gene *phoA*).

4.3.3 PCR

Para as reações de PCR, foi utilizado o kit GoTaq[®] Green Master Mix (Promega Corporation, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O protocolo de termociclagem empregado (Swift[®] MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) foi: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, e, em seguida, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C

por 45 seg, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 min (SHOME *et al.*, 2011). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 8µL por amostra, adicionado de um volume de 2µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5, (BlueJuice® Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). Na sequência, o gel foi submetido à coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA). Em seguida, o gel foi observado à luz UV, utilizando-se sistema de foto documentação L-Pix ST e software L-PixImage (LoccusBiotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética de um marcador de peso molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA).

Tabela 4. Sequência dos primers utilizados na confirmação dos microrganismos mais frequentes no isolados no isolamento de mastite subclínica em búfalas.

Organismo	Primer	Sequencia primer 5'-3'	Gene	Produto (pb)
<i>Staphylococcus aureus</i>	SAS2F SAS2R	AGCGAGTCTGAATAGGGCGTTT CCCATCACAGCTCAGCCTTAAC	sodA, rdr e gap	894
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	SCHS1F SCHS1R	GCGTACCAGAAGATAAACAACACTC CATTATTTACAACGAGCCATGC	sodA, rdr e gap	222
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SHS1F SHS1R	CAAATTAAATTCTGCAGTTGAGG AGAGCCCATTGTTCTTTGA	sodA, rdr e gap	214
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SERF SERR	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG TCGATACCATCAAAAAGTTGG	sodA, rdr e gap	130
<i>Staphylococcus sciuri</i>	SSCGF SSCGR	GATTCCGCGTAAACGGTAGAG CATCATTTAATACTTTAGCCATTG	sodA, rdr e gap	306
<i>Staphylococcus simulans</i>	SSMF SMR	AGCTTCGTTTACTTCTTCGATTGT AAAAGCACACAAGCTCACATTGAC	sodA, rdr e gap	472
<i>Streptococcus agalactiae</i>	STAGF STAGR	STAGF- GCTAATACCGCATAAGAGTAATTAAC STAGR-GGTAGATTTTCCACTCCTACCAA	cpn60 e phoA	317
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	STDGF STAGR	GGGAGTGGAAAATCCACCAT AAGGGAAAGCCTATCTCTAGACC	cpn60 e phoA	572
<i>Streptococcus uberis</i>	STUBF STUBR	TCGCGGTATTGAAAAAGCAACAT TGCAATAATGAGAAGGGGACGAC	cpn60 e phoA	400
<i>Escherichia coli</i>	ECPF ECPR	GGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTG CAGGGTTGGTACACTGTCATTACG	phoA	468

4.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

O perfil de sensibilidade antimicrobiana foi determinado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado (CLSI, 2006). Treinta e duas colônias bacterianas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 a 5 mL de caldo nutriente e incubadas a 35°C por um período suficiente (2-6 horas) para apresentar uma turbidez equivalente a 0,5 da escala Mac Farland. Em seguida, foi realizada a semeadura em placa de cultura com o auxílio de *swabs* sobre a superfície do meio de ágar Müller Hinton.

A etapa seguinte consistiu na distribuição dos discos estéreis através de uma leve pressão para permitir o contato entre os mesmos e a superfície do meio inoculado., Os agentes antimicrobianos utilizados nos discos nas concentrações indicadas. Para bactérias gram negativas, foram: Cefalotina (30µg), Ampicilina (10µg), Meropenem (10µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (25µg), Cefuroxima (30µg), Amoxicilina + clavulanato (30µg), CiprCefoxitina (30µg), Cefepime (30µg), Ceftazidima (30µg), Gentamicina (10µg) e para as gram positivas: Gentamicina (10µg), Vancomicina (30µg), Clindamicina (2µg), Eritromicina (15µg), Penicilina G (10µg), Sulfazotrim (25µg), Oxacilina (1µg), Cefepime (30µg), Tetraciclina (30µg), Rifampicina (34µg). As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Após a leitura dos halos formados ao redor dos discos, foi determinado o perfil de sensibilidade e resistência dos isolados de acordo com o manual para antibiograma difusão em disco Kirby-Bauer elaborado pela fabricante de discos (Laborclin, Brasil).

4.5 Análise dos dados

A análise dos resultados dos patógenos obtidos foi realizada de forma descritiva. Os valores foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados às informações disponíveis na literatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das propriedades

As principais características das propriedades visitadas estão apresentadas na Tabela 5. As quatro propriedades são consideradas de porte médio em termos de produção de leite. As propriedades (A e B) eram participantes do selo de pureza 100% Búfalo que é um programa de controle da pureza de leite de búfala em queijos realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalo (ABCB).

As condições de higiene das propriedades foram avaliadas em linhas gerais considerando os seguintes itens: sala da ordenha, equipamento de ordenha, tanque de armazenamento do leite e condições dos ordenadores. A avaliação dos itens foi realizada com base em questionário (ANEXO 3) previamente preparado conforme a lista de verificação de Boas Práticas de Fabricação contidas na Resolução ANVISA nº 275 (BRASIL, 2002).

Foram consideradas como grupo 1 (boas condições) as propriedades que atenderam mais de oito dos seguintes itens: (1) mão de obra qualificada (com treinamento), (2) uso de luvas descartáveis durante a ordenha, (3) realização de *pré-dipping*, (4) realização de *pós-dipping*, (5) realização de algum teste para mastite subclínica, (6) limpeza diária das instalações de ordenha (7) ambiente de ordenha calmo sem a presença de outros animais, (8) registro de dados, (9) acompanhamento veterinário e, (10) sala de ordenha com estrutura adequada. Os laticínios classificados como grupo 2 (condições regulares) foram aqueles que atenderam de cinco a oito dos requisitos acima, e os laticínios classificados com grupo 3 (condições ruins) foram aqueles que atenderam menos de cinco requisitos. No total, das quatro propriedades, duas foram classificadas como grupo 1 (A e C), uma como grupo 2 (B) e outra como grupo 3 (D).

Quanto ao sistema de ordenha utilizado, três propriedades (A, C e D) possuíam sistema de ordenha tipo tandem (fila indiana), no qual as búfalas ficavam dispostas uma em frente a outra, em posição paralela ao fosso. Este tipo de ordenha possibilita a ordenha mecanizada com bezerro ao pé. A fazenda B possui ordenha tipo tandem sem fosso, o qual dificulta a limpeza dos tetos das búfalas. Nesse caso, o manejo dos animais gera mais esforço por parte dos trabalhadores com a ordenha feita também com presença do bezerro.

A frequência de ordenha adotado nas propriedades (A, B e C) é de duas vezes ao dia, as 5:00h e 14:00h, já na propriedade D, é de uma vez ao dia, pela manhã.

Tabela 5. Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas no Estado de São Paulo.

	Propriedades			
	A	B	C	D
Produção total/dia em litros	800	600	450	540
Búfalas em lactação	140	52	46	56
Realiza teste CMT	Sim	Sim	Sim	Não
Realiza teste CCS	Sim	Sim	Sim	Não
Tipo de ordenha	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica
Condições higiênicas da ordenha	1	2	1	3
<i>Pré-dipping</i>	Sim	Sim	Sim	Não
<i>Pós-dipping</i>	Sim	Não	Não	Não
Desinfecção teteiras entre ordenhas	Sim	Sim	Sim	Sim

As propriedades rurais A, B e C realizavam o teste CMT regularmente, enquanto que o teste ainda não foi implantado na propriedade D. Este teste é muito rápido e simples para a detecção de mastite subclínica, fazendo uma estimativa da contagem de células somáticas (CCS) no leite de amostras individuais ou compostas dos quartos do animal. Excepcionalmente, o teste de caneca de fundo preto é realizado apenas na propriedade C para detectar mastite clínica no momento da ordenha.

Nas propriedades visitadas, não foram observadas búfalas com mastites pelos testes realizados separadas das demais durante o período experimental. A CCS era realizada mensalmente na propriedade A, enquanto nas propriedades B e C a CCS era realizada a cada dois meses e propriedade D não realizava o teste; entretanto, o teste começou a ser realizado no momento que se iniciou o experimento.

As condições gerais das instalações de ordenha da propriedade A podem ser visualizadas na Figura 3, na qual as búfalas são lavadas na sala de espera. Essa atividade ainda necessita de avaliação científica visando definir as vantagens e desvantagens do sistema, já que pode aumentar o risco de contaminação do leite, mas por outro lado promover uma limpeza do animal

já que as búfalas podem estar muito sujas. Nesses casos, é importante evitar que as búfalas sejam ordenhadas enquanto estiverem molhadas.

Figura 3. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A–Mao de obra. B – Uso de luvas. C - Equipamento de ordenha. D - pré-dipping e pós-dipping. E – Kit de coleta de amostras Clínica do Leite. F – Teteira de ordenha.

Para a limpeza dos tetos, três propriedades (A, B e C) utilizam papel toalhas descartáveis, individuais para cada teto. Nessa desinfecção da superfície dos tetos, realizam o *pré-dipping* com imersão completa dos tetos em solução iodada 10%. Na Propriedade D não é realizado nenhum destes procedimentos. O *pré-dipping* é uma medida de controle muito importante porque ajuda a reduzir a contaminação da pele dos tetos, melhorando a qualidade do leite e a prática de secar os tetos auxilia a maiores reduções da Contagem padrão em placa (CPP). Além dos efeitos positivos sobre a qualidade do leite, os procedimentos de preparação do úbere antes da ordenha têm efeito importante sobre a ocorrência de novas infecções intramamárias, visto que o risco de ocorrência dessas infecções está diretamente associado com a intensidade de contaminação da extremidade do teto (GUERREIRO *et al.*, 2005). Somente a propriedade A faz *pós-dipping* após a ordenha, sendo esta uma das atividades mais importantes no controle de mastite. Nesta propriedade quando o animal apresenta mastite é submetido a tratamento de vaca seca e em casos mais extremos a tratamento com antibióticos, controlando desta forma a mastite.

Na propriedade B, logo após a ordenha, o bezerro é solto para permitir que ele mame diretamente na sua mãe (Figura 4). Isto é importante, pois com a ingestão de leite pelo bezerro ocorre o esvaziamento completo do úbere, evitando que o leite residual na glândula mamária possa propiciar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis causadores de mastites. Algumas búfalas defecam durante a ordenha.

Figura 4. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A– Teteira de ordenha. B – Sala de ordenha. C - Mão de obra. D - Equipamento de ordenha E – Entrada das búfalas nas instalações.

Nas propriedades B, C e D as fezes são removidas com uma pá e são colocadas numa calha de drenagem. Na propriedade A as fezes são removidas com rodo e lavagem consecutivo do local, entretanto, essa prática deve ser evitada enquanto as búfalas estiverem na sala de ordenha, pois isso aumenta o risco de contaminação. Em todas as propriedades, imediatamente após a ordenha, era realizada a limpeza das instalações e dos equipamentos. Para a lavagem e desinfecção de equipamentos de ordenha mecanizada, foram seguidas as instruções do fabricante. A realização da lavagem do equipamento de ordenha influencia diretamente no nível de contaminação microbiana do leite, já que a ausência ou a lavagem mal realizada favorece a multiplicação de uma grande variedade de microrganismos que ficam aderidos à superfície interna dos equipamentos e acessórios. Depois de determinado tempo, as bactérias se multiplicam e se aderem ao equipamento de ordenha, formando um biofilme, que constitui uma importante

fonte de contaminação, cuja remoção é bastante difícil pela limpeza normal (ROSONI & GAYLARDE, 2000).

A propriedade C é caracterizada por possuir um manejo orgânico das búfalas, com regras específicas para sua alimentação e controle de doenças. Quando alguma búfala apresenta mastite, primeiramente ela é isolada do rebanho deixando que o bezerro mame para tirar todo o leite, mas caso o problema se agrave para mastite crônica são utilizados medicamentos adequados. Nas propriedades A, C e D é fornecida alimentação para a búfala logo após sua saída da sala de ordenha. Ao oferecer o alimento, deduz-se a possibilidade de que a vaca se deite (SARGEANT *et al.*, 2001). É fundamental que ela permaneça em pé por, pelo menos, 30 minutos para que o esfíncter do teto se feche, diminuindo o risco de mastite ambiental.

As instalações de ordenha da propriedade C podem ser observadas na Figura 5. Excepcionalmente, esta propriedade realiza a retirada dos primeiros jatos do leite para a detecção de mastite clínica, prática que também ajuda a estimular a “descida” do leite e a observar a presença de uma maior concentração microbiana.

Figura 5. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A–Teste da caneca de fundo preto e pré-dipping. B – Equipamento de ordenha. C – Sala de ordenha. D - Teteira de ordenha. E – Mao de obra.

Na figura 6 pode-se observar as instalações de ordenha da propriedade D. Neste caso, destaca-se a necessidade de implantação de práticas adequadas de higienização da sala de ordenha. A ausência de lavagem das mãos é uma das fontes de transmissão de patógenos causadores de mastite, tais como *Staphylococcus aureus*. Desta forma, recomenda-se, antes da ordenha, a lavagem completa das mãos dos ordenadores com água e sabão, seguida, preferencialmente, pela desinfecção em solução desinfetante (cloro, iodo ou clorexidina). Como alternativa, pode-se recomendar o uso de luvas de látex ou vinil pelos ordenadores durante a ordenha.

Figura 6. Condições das instalações da ordenha na propriedade. A – Equipamento de ordenha. B – Sala de ordenha. C – Glândula mamária. D – Bezerros indo a mamar. E – Presença de cachorros na sala de ordenha.

Em síntese, foi observado que as propriedades analisadas apresentaram particularidades quanto ao tipo de mão de obra, número de animais, sistemas de produção, duração da ordenha, produção diária de leite, diferentes métodos de detecção de mastite, divergências na manutenção de coleta de dados e monitoramento da saúde da glândula mamária.

5.2 Contagem padrão em placa (CPP) e Contagem de células somáticas (CCS)

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6. Tendo-se como base a Instrução Normativa Nº62 DE 2011 do MAPA que trata de padrões microbiológicos para leite bovino, das 20 amostras analisadas neste trabalho, apenas 1 (5%) estava dentro do padrão estabelecido (1×10^4 UFC/mL) com uma variação nos resultados encontrados de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL a $7,7 \times 10^5$ UFC/mL. Isso já era esperado, uma vez que as amostragens foram realizadas apenas nas búfalas que tiveram CCS alto, visando obter amostras com os prováveis microrganismos causadores de mastite subclínica.

Tabela 6. Contagem de células somáticas e contagem padrão em placa em amostras de leite das búfalas.

Propriedade	Animal	CCS (cel/mL x 1000)	CPP (UFC/mL)
A	1	236	$4,0 \times 10^4$
	2	205	$5,7 \times 10^4$
	3	236	$6,9 \times 10^4$
	4	245	$1,0 \times 10^4$
	5	224	$4,2 \times 10^4$
B	6	1121	$7,3 \times 10^5$
	7	1346	$1,0 \times 10^5$
	8	1323	$6,9 \times 10^5$
	9	304	$1,6 \times 10^5$
	10	376	$1,1 \times 10^5$
C	11	292	$4,8 \times 10^4$
	12	215	$9,2 \times 10^4$
	13	336	$2,1 \times 10^4$
	14	306	$1,2 \times 10^4$
	15	211	$1,8 \times 10^4$
D	16	1334	$7,0 \times 10^5$
	17	2264	$1,2 \times 10^5$
	18	1365	$1,3 \times 10^5$
	19	1247	$6,9 \times 10^5$
	20	1243	$7,7 \times 10^5$

Em estudo realizado por Silva et al. (2012), no Estado do Maranhão com búfalas, apenas 6 (33,33%) estavam dentro dos padrões, segundo esta mesma normativa. Os altos níveis de bactérias têm efeito negativo sobre a qualidade do leite, especialmente no que concerne ao sabor,

à vida de prateleira e à segurança alimentar do produto disponibilizado ao consumidor. Essa informação é muito importante para a bubalinocultura leiteira já que o leite bubalino é destinado na sua totalidade para a produção de leite e derivados (ANDRIGHETTO, 2004) e a qualidade do leite influi diretamente na qualidade da muçarela de búfala.

Produtores rurais devem canalizar esforços na melhoria das condições higiênicas durante a ordenha e com o armazenamento do leite, mantendo sua refrigeração rápida na temperatura de 4°C, para reduzir os níveis de contaminação microbiana. Durante a ordenha, condições inadequadas de produção e higiene comprometem a qualidade do leite, já que sujidades, microrganismos e substâncias químicas, presentes no próprio local de ordenha, podem ser imediatamente incorporadas ao produto. O número de bactérias acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL é indicativo de deficiências de higiene na produção de leite (MURPHY, 1997).

O valor médio obtido de contagem de células somáticas nas 20 amostras analisadas foi de 721.000 cel/mL de leite (valor mínimo: 205.000, valor máximo: 2.264.000), indicando presença de mastite subclínica (Tabela 6). Essa média foi alta em comparação com o obtido a partir de búfalos no Estado de São Paulo em estudo realizado por Cerón-Muñoz et al. (2002a), no qual analisaram 5.931 dados referentes à CCS do leite de 773 búfalas em lactação provenientes de nove rebanhos, observando como resultado médio geral 79.000 cel/mL. Em outro estudo, Cerón-Muñoz et al. (2002b), analisaram 2.693 amostras de leite de búfalas pertencentes a um único rebanho e verificaram valores médios de 63.000 cel/mL, enquanto em estudo realizado por André *et al.*, (2005), no Brasil com dados de 38 búfalas em lactação, nos anos de 2002 e 2003 obteve-se média para a CCS de 63.380 cel/mL. Dhakal, (2006) observou mastite subclínica em amostras de leite de búfala com contagem de células somáticas acima de 200.000 cel/mL com crescimento bacteriano positivo em cultura em 21,7% das búfalas avaliadas. Mais recentemente, Dhakal et al. (2008) estudaram a contagem de células somáticas de 216 quartos de 54 bubalinos mestiços da raça Murrah, sendo a média de CCS do leite de 171.000 cel/mL para animais sem mastite, 799.000 cel/mL para animais com mastite subclínica e 6.039.000 cel/mL para animais com mastite clínica.

Medeiros et al. (2011) observaram que as amostras positivas no exame microbiológico apresentaram CCS entre 280.000 e 401.000 cel/mL, com média de 328.000 cel/mL concluíram que valores de CCS acima de 280.000 cel/mL são indicativos de infecção da glândula mamária.

Ainda não há um padrão de qualidade para o leite bubalino. Dados da literatura mostram baixas CCS no leite bubalino quando comparado ao leite bovino. Características de resistência a mastite têm sido pesquisadas em relação a anatomia e fisiologia da glândula mamária das búfalas. Essas incluem 23% de maior atividade da enzima lactoperoxidase quando comparado com a vaca (KUMAR & BHATIA, 1994), quantidade superior da proteína lactoferrina no leite de búfala (BHATI & VALSA, 1994), maior concentração de pigmentos de melanina, camada mais grossa de queratina do lúmen do ducto papilar do teto da búfala quando comparado da vaca (UPPAL *et al.*, 1994), camada muscular do esfíncter ao redor do canal do teto mais espessa e organizada, com maior tônus, mais rica em vasos sanguíneos e fibras nervosas. A lactoferrina, uma substância antibacteriana presente no leite, compete com as bactérias pelo ferro, tornando-o indisponível e impedindo o crescimento bacteriano (JORGE *et al.*, 2005).

5.3 Análise Microbiológico e bioquímica das bactérias isoladas

Considerando a análise microbiológica, em todas as amostras houve crescimento de bactérias. O total de microrganismos isolados de acordo com o número de isolamentos em cultura pura foi de 200 colônias (Tabela 8). *Staphylococcus epidermis* (17%) foi o microrganismo isolado com maior frequência, seguido pelo *Staphylococcus aureus* (15%) e pelo *Bacillus* spp. (14%).

Quanto à prevalência dos microrganismos isolados de mastite subclínica em bubalinos, os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos observados por Oliveira et al. (2004) em 49 búfalas adultas, da raça Murrah, em diferentes estádios de lactação, procedentes de municípios do Estado de Pernambuco, Brasil. Os autores concluíram que bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são os principais agentes etiológicos nesse tipo de infecção, sendo de grande importância epidemiológica nas mastites bubalinas. De forma semelhante, Dhakal et al. (2007) isolaram em amostras de 23 búfalas mestiças Murrah com mastite subclínica o gênero *Staphylococcus* spp. como principal patógeno, com frequência de 33.3% das amostras analisadas. Em outro estudo realizado por Dhakal et al. (2008), novamente detectaram *Staphylococcus* spp. como o principal agente causador de mastite subclínica. Mais recentemente Chavosqui & Husaini, (2012) obtiveram resultado semelhante para análise microbiológica; *Staphylococcus* Coagulase negativa (CNSs) (34.5%), *Streptococcus* spp. (21%) e *Bacillus* spp. (13%).

Tabela 7. Análise microbiológica e bioquímica em amostras de leite de búfalas.

Patógenos isolados	Numero de patógenos	Frequência %
<i>Staphylococcus epidermis</i>	34	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	15
<i>Bacillus</i> spp.	28	14
<i>Acinetobacter</i> spp.	25	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	9,5
<i>Shigella flexneri</i>	14	7
<i>Streptococcus</i> spp.	11	5,5
<i>Corynebacterium</i> spp.	10	5
<i>Escherichia coli</i>	9	4,5
<i>Serratia marcescens</i>	8	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8	4
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	1	0,5
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0,5
<i>Tatumella ptyseos</i>	1	0,5
<i>Enterobacter clocae</i>	1	0,5
Total	200	100

Ressalta-se que o gênero *Staphylococcus* spp. foi o mais encontrado no presente trabalho com 32% dos isolamentos realizados, dados que corroboram os resultados de Khan & Muhammad (2005), Cunha et al. (2006), Reza et al. (2011) e Nogueira et al. (2012) os quais relataram, respectivamente, a frequência de 45%, 50,62%, 41,2% e 26,6% de *Staphylococcus* spp. Outros resultados que também se aproximam dos aqui obtidos foram reportados por Costa et al. (2000), os quais isolaram 20,97% de *Staphylococcus* spp. No presente estudo a espécie *S. epidermis* foi a mais isolada com uma frequência de (17%); resultados similares são reportados por Dhakal, (2006) que coletou dados a partir de 60 búfalos com mastite subclínica com CCS >200.000 cel/mL em cinco fazendas de Chitwan Nepal, sendo que os patógenos predominantes pertenceram aos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, no entanto o microrganismo mais isolado foi *Staphylococcus epidermis* com uma frequência de 58%, seguido por *Staphylococcus aureus*.

No entanto, outros pesquisadores verificaram resultados diferentes, dentre os quais podem ser citados Costa et al. (1997) ao encontrarem uma prevalência de 59,25% de *Corynebacterium* spp. e 17,59% de *Staphylococcus* spp. No Brasil, Langoni et al. (2001) isolaram 31,7% de

Corynebacterium bovis como o microrganismo mais frequente em 154 amostras de leite, provenientes de 61 búfalas em lactação da raça Murrah, com mastite subclínica, no município de Sarapuí, Estado de São Paulo. Mais recentemente Bonini Pardo et al. (2007) investigaram o perfil bacteriano em amostras de leite de búfala positivas ao CMT no Estado de São Paulo, verificando positividade de 51,47% para *Corynebacterium* spp. e 17,65% corresponde a gênero *Staphylococcus*.

A diferença observada nos estudos anteriormente descritos está relacionada, possivelmente, ao tipo de manejo adotado, em particular no que se refere às medidas sanitárias adotadas no momento da ordenha, coleta das amostras e instalações que pode ter favorecido a contaminação e multiplicação de diferentes agentes infecciosos na glândula mamária. Algumas ações na preparação na sala de ordenha favorecem a infecção por penetração de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. como a deficiência na limpeza dos equipamentos de ordenha, sala de ordenha, ordenhador, etc., os quais podem ser veículos de difusão desta bactéria no canal galactóforo, de grande contagiosidade e fácil transmissibilidade.

Ainda em relação aos patógenos Gram-positivos, o isolamento de *Bacillus* spp. no leite de búfalas foi relativamente alto (14%), coincidindo com os resultados obtidos por Chavosqui & Husaini (2012) de 13% amostras positivas para este microrganismo. Entretanto, contrastam com os resultados obtidos por Paranjape & Das (1986), Saini et al. (1994), Langoni et al. (2001) e Cunha (2006), os quais isolaram esses agentes em percentuais mais baixos, provavelmente essas divergências são explicadas pela espécie, modo de coleta do material e tipo de manejo realizado na propriedade.

Streptococcus spp. foi com menor frequência de isolamento no leite de búfalas (5,5%), resultados similares são encontrados em vários estudos de mastite subclínica em búfalos, como Oliveira et al. (2004), Kapronezai et al. (2005), Chavosqui & Husaini et al. (2012) que obtiveram uma frequência de isolamento de 2,2%, 3,1%, 8,0%, respectivamente. Embora sejam considerados agentes menos frequentes das mastites, esses patógenos oportunistas estão muito difundidos no ambiente, podendo-se encontrar no chão, água e esterco, e assumirem importância epidemiológica, pois geralmente estão associados a lesões nos tetos (BEDOLLA et al., 2012).

Em contrapartida em outros estudos (FAGIOLO & LAI, 2002) o principal patógeno associado com mastite subclínica foi *Streptococcus* spp. 39%, seguido por *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. com uma frequência de 37% e 24%, respectivamente.

A frequência de isolamento de *Escherichia coli* neste estudo foi baixa, com uma porcentagem de 4,5%, este resultado pode ser comparados com os obtidos na pesquisa de Saini et al. (1994) que isolaram *Staphylococcus aureus* 54,0%, *Staphylococcus* coagulase negativa 19,4%, *Streptococcus* spp. 12,9% sendo o microrganismo isolado com menos frequência *Escherichia coli* 12,9%. Diferentes proporções foram obtidas por Kumar et al. (2009) que avaliaram 60 amostras de leite com mastite e obtiveram 30% das amostras com *Escherichia coli*., 21% de *Staphylococcus aureus*, 9%, de *Streptococcus agalactiae*, de 9% *Streptococcus dysagalactiae* e 7% para *Streptococcus uberis*.

Cabe destacar a grande importância da contaminação do leite por bactérias do gênero *Pseudomonas*, por serem microrganismos psicrotróficos, que se multiplicam em temperaturas de refrigeração constituindo problema emergente para os profissionais da área de inspeção sanitária e de qualidade do leite (FERNANDES et al. 2009).

5.4 Identificação das linhagens isoladas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*

Dos isolamentos bacterianos caracterizados bioquimicamente, 32 foram testadas para os genes de espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* (genes rRNA 23S, *sodA*, *rdr* e *gap*) e *Streptococcus* (genes rRNA 16S, *cpn60* e *phoA*) e *Escherichia coli* (gene *phoA*), através da técnica reação em cadeia pela polimerase (PCR), distribuídos da seguinte forma: 8 colônias de *Staphylococcus aureus* amplicon de 894pb, 8 colônias de *Staphylococcus epidermis* (130bp), 8 para o gênero *Streptococcus* (317pb, 572pb e 400pb) e 8 para *Escherichia coli* (468 bp).

Verificou-se que as 24 amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Escherichia coli* possuíam os genes correspondentes. (Figuras 7, 8 e 9, respectivamente). Para o gênero *Streptococcus* foi achado um tamanho de banda para duas amostras entre 500 e 600 pb correspondente a *Streptococcus dysagalactiae* e para as outras seis amostras de 300 bp indicando a presença de *Streptococcus agalactiae* (Figura 10).

Figura 7. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos de aproximadamente 894pb, relativo aos genes (rRNA 23S, *sodA*, *rdr* e *gap*) do *Staphylococcus aureus*, obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 29213 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.

A confirmação do tipo de microrganismo por meio da PCR foi possível em todas as amostras testadas neste estudo. Shome et al. (2011) encontraram que a PCR, quando é utilizado para a detecção de agentes patogênicos em amostras de leite de mastite subclínica de vacas é mais eficaz que os estudos microbiológicos. Resultados similares são reportados por (TAPONEN *et al.*, 2009) que isolaram os patógenos mais comuns causadores de mastite em amostras de leite bovina que em algumas ocasiones não tiveram crescimentos microbiológicos e que pela técnica de PCR foram identificadas.

Figura 8. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos de aproximadamente 130pb, relativo aos genes (rRNA 23S, *sodA*, *rdr* e *gap*) do *Staphylococcus epidermis*, obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 12228 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.

Resultados similares foram reportados por Koskinen et al. (2009) que pesquisaram bactérias da mastite bovina (n = 454) utilizando o teste de PCR em tempo real. Este método permitiu a identificação correta para todos os isolados, ou seja, a especificidade e sensibilidade analíticas foram de 100% para todos os tipos de bactérias. Como na infecção por mastite estão envolvidas várias espécies de bactérias são necessárias a utilização de técnicas de detecção e identificação fenotípicas e bioquímicas adequadas, entretanto, elas podem atrasar as intervenções oportunas no tratamento e controle convencional da doença, uma vez que são técnicas laboriosas que necessitam de ampla experiência por parte do operador.

Figura 9. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de aproximadamente 468pb, relativo ao gene (*phoA*) do *Escherichia coli*, obtidos através da técnica de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Cepa padrão ATCC 43895 (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade A (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade B (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade C (9) Amostra propriedade D (10) Amostra propriedade D.

A cultura bacteriana convencional é de desempenho relativamente lento, já que a incubação de culturas primárias muitas vezes exige 48 horas (ou 72 horas) para ser concluída, e testes confirmatórios adicionais são relativamente demorados (Conselho Nacional de Mastite, 1999). Para superar este problema, os kits de diagnóstico de cultivo que permitem resultados mais rápidos foram previamente introduzidos para testes de mastite, mas as precisões de diagnósticos são limitadas (SIMOJOKI *et al.*, 2008). O ensaio de PCR para identificação de microrganismos em amostras de leite bovina com mastites requer um tempo de análise de 3 a 4 horas. No caso da mastite subclínica, tais resultados rápidos podem permitir a identificação dos animais com esta doença e começar o tratamento, melhorar o resultado com uso adequado de antibióticos e diminuir o uso indiscriminado dos mesmos.

Figura 10. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação dos fragmentos aproximadamente de 317 e 572 pb, relativo aos genes (rRNA 16S, *cpn60* e *phoA*) do *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, respectivamente. Obtidos através das técnicas de PCR, a partir de amostras incubadas em Caldo BHI durante 24 horas. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Amostra propriedade A (3) Amostra propriedade A (4) Amostra propriedade B (5) Amostra propriedade B (6) Amostra propriedade C (7) Amostra propriedade C (8) Amostra propriedade D (9) Amostra propriedade D.

O ensaio de PCR utilizado neste estudo fornece um meio conveniente de identificar com precisão alguns dos patógenos bacterianos importantes envolvidos nesta doença. Como a prova de PCR baseia-se na identificação de DNA bacteriano, o que não depende da viabilidade das bactérias crescerem em um ambiente de laboratório, potencialmente podem também detectar bactérias mortas ou ainda bactérias em processo de inibição do crescimento.

5.5 Perfis de sensibilidade a antimicrobianos *in vitro*

Para a realização do teste do perfil de resistência foram utilizadas 32 cepas isoladas (8 de *Staphylococcus aureus*, 8 de *Staphylococcus epidermis*, 8 de *Streptococcus* spp. e 8 de *Escherichia coli*). Com a realização do antibiograma, foi possível traçar um perfil de resistência

para diferentes antibióticos testados. O estudo de sensibilidade bacteriana mostrou que para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* os antibióticos de maior ação foram gentamicina e vancomicina (Tabela 8). Na avaliação do perfil da sensibilidade *in vitro* para diferentes antibióticos, a gentamicina foi o antibiótico que demonstrou o maior percentual de eficácia em relação aos isolados 97,98%, seguida pelo florfenicol 93,94% e enrofloxacin (90,90%), fazendo destes uma opção de tratamento sistêmico associado ao uso intramamário da gentamicina (CUNHA *et al.*, 2006). Ainda segundo estes autores, a penicilina e a tetraciclina foram às drogas que apresentaram a menor eficácia *in vitro* (65,66% e 58,58% respectivamente) a partir das amostras isoladas no estudo. Os *Staphylococcus* spp. foram mais sensíveis à enrofloxacin 93%, seguido de gentamicina 92,5% no ano de 2002. A sensibilidade de bactérias desse gênero diminuiu no ano 2005 em relação a estes mesmos antibióticos apresentando uma eficiência de 80% para enrofloxacin e 71,4% para gentamicina. Adicionalmente, a ampicilina foi o antibiótico menos eficaz, em 2002, sua sensibilidade foi de 70,7% e caiu para 53,3% em 2005 (DHAKAL *et al.*, 2007). Observou-se maior padrão de resistência frente aos beta-lactâmicos, penicilina, amoxicilina, ampicilina (média 51,77%) e menor frente à cefalotina, vancomicina, cefoxitima e a gentamicina com 0% de resistência (BONNA *et al.*, 2007). Andrade (2012) estudando 116 amostras de leite bovina, apresentou um escore de 3+ no teste do Californian Mastit Test, verificando que os antibióticos que exibiram melhor resultado de sensibilidade *in vitro* para *Staphylococcus aureus* foram gentamicina (79,8%), neomicina (76,9%), norfloxacin (76,9%), cefalexina (74,1%), cefazolina (74,1%), lincomicina (74,1%), oxacilina (74,1%), tetraciclina (74,1%), tobramicina (74,1%) e ceftiofur (71,2%). Reza et al (2011) observaram que o *Staphylococcus aureus* foi sensível à 14 agentes antimicrobianos testados (amicacina, ampicilina, cefaloxina, cefalotina, cephtiofur, cephqinome, cloxacilina, gentamicina, lincomicina, enrofloxacin, eritromicina, novobicina, trimetropim + sulfametazol tetraciclina e tilozina), mas não a penicilina, cloxacilina e bacitracina. Nogueira et al. (2012) pesquisaram a prevalência e a etiologia da mastite subclínica em 120 búfalas e identificaram o *Staphylococcus* spp. (26,0%) como o agente isolado com maior frequência. Os resultados dos antibiogramas mostraram que todas as amostras testadas foram sensíveis para gentamicina e a ciprofloxacina.

Assim, observa-se que o resultado do perfil de sensibilidade antimicrobiana do *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos gentamicina e vancomicina é uma importante

informação no âmbito técnico, principalmente para profissionais que atuam a campo e que não dispõem de estrutura para procedimentos laboratoriais para tratamento de mastites em bubalinos.

Tabela 8. Perfil ao teste de sensibilidade *in vitro* das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobiano	Perfil de Sensibilidade			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermis</i>	
	N	%	N	%
Gentamicina (10µg/disco)	8/8	100	8/8	100
Vancomicina (30µg/disco)	8/8	100	8/8	100
Clindamicina (2µg/disco)	4/8	50	4/8	50
Eritromicina (15µg/disco)	4/8	50	4/8	50
Penicilina G (10µg/disco)	2/8	25	3/8	37,5
Sulfazotrim (25µg/disco)	4/8	50	4/8	50
Oxacilina (1µg/disco)	4/8	50	4/8	50
Cefepime (30µg/disco)	4/8	50	4/8	50
Tetraciclina (30µg/disco)	2/8	25	3/8	37,5
Rifampicina (34µg/disco)	4/8	50	4/8	50

Para o gênero *Streptococcus* spp., a gentamicina e a oxacilina foram os antibióticos de melhor ação, seguido pela sulfazotrim (Tabela 9), corroborando com Langoni et al. (2001) que mostraram que para os agentes isolados com maior frequência, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*, a gentamicina (96%) e a oxacilina (95%) foram os antibióticos mais eficientes. Resultados similares para a gentamicina foram obtidos por Saini et al. (1994) que pesquisaram a prevalência e a etiologia da mastite subclínica em 241 búfalas, isolando *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*. Os resultados dos antibiogramas mostraram que 90% das amostras testadas foram sensíveis à gentamicina, cloranfenicol, cotrimoxazol e nitrofurantoína. *Streptococcus* spp. mostrou 87,5% de sensibilidade para gentamicina no ano de 2002, que caiu para 83,3% no ano de 2005, mas, ainda assim, a gentamicina apresentou a melhor eficiência (DHAKAL et al., 2007). No entanto, resultados reportados por Reza et al. (2011) mostraram para *Streptococcus* spp., alta

susceptibilidade à cephquinome e cephtiofur. Em búfalos, amoxicilina + ácido clavulânico foram mais eficazes, com uma taxa de sensibilidade de 92% (OZENC, 2008).

Tabela 9. Perfil ao teste de sensibilidade *in vitro* das bactérias *Streptococcus* spp. isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobiano	Perfil de Sensibilidade	
	<i>Streptococcus</i> spp.	
	N	%
Gentamicina (10µg/disco)	8/8	100
Vancomicina (30µg/disco)	2/8	25
Clindamicina (2µg/disco)	2/8	25
Eritromicina (15µg/disco)	2/8	25
Penicilina G (10µg/disco)	1/8	12,5
Sulfazotrim (25µg/disco)	6/8	75
Oxacilina (1µg/disco)	8/8	100
Cefepime (30µg/disco)	2/8	25
Rifampicina (34µg/disco)	2/8	25

O perfil de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* mostrou que a gentamicina foi um dos antimicrobianos menos efetivos (50%) (Tabela 10). Concordando com os dados de Da Costa et al. (2010) que observaram os aminoglicosídeos e as sulfas como os agentes antimicrobianos de menor eficácia para *Escherichia coli*, destacando-se o percentual de sensibilidade de 46,2% e 41,8%, para gentamicina e neomicina, respectivamente.

Entretanto, resultados diferentes foram encontrados por Saini et al. (1994), que pesquisaram a prevalência e a etiologia da mastite subclínica em 241 búfalas. Eles observaram o isolamento de microrganismos em 76,13% das amostras de leite bovina examinadas, como sendo: *Staphylococcus aureus* (54,0%), *Staphylococcus* coagulase negativa (19,4%), *Streptococcus* spp. (12,9%) e *Escherichia coli* (12,9%). No antibiograma, 90% das amostras testadas foram sensíveis para gentamicina, cotrimoxazol e nitrofurantoína.

Tabela 10. Perfil ao teste de sensibilidade *in vitro* das bactérias *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite de búfalas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobiano	Perfil de Sensibilidade	
	<i>Escherichia coli</i>	
	N	%
Cefalotina (30µg/disco)	6/8	75
Ampicilina (10µg/disco)	8/8	100
Meropenem (10µg/disco)	6/8	75
Sulfametoxazol + Trimetoprim (25µg/disco)	6/8	75
Cefuroxima (30µg/disco)	6/8	75
Amoxicilina + clavulanato (30µg/disco)	5/8	62,5
Cefoxitina (30µg/disco)	6/8	75
Cefepime (30µg/disco)	6/8	75
Ceftazidima (30µg/disco)	6/8	75
Gentamicina (10µg/disco)	4/8	50

6. CONCLUSÕES

A contagem de células somáticas e Contagem padrão em placa demonstraram que são testes que permitem fazer uma avaliação do estado de saúde da glândula mamária de búfalas com mastite subclínica e a importância de realizar uma normativa para esta espécie que permita o controle e fiscalização deste produto.

A caracterização fenotípica e genotípica das bactérias envolvidas com a mastite subclínicas no leite bubalino demonstrou que bactérias do gênero *Staphylococcus* (32%) com duas espécies, o *Staphylococcus epidermis* (17%) e o *Staphylococcus aureus* (15%) foram as mais prevalentes, seguidas da *Bacillus* spp. (14%) e *Acinetobacter* spp. (12,5%).

A avaliação comparativa da PCR com a caracterização fenotípica e bioquímica utilizando 32 microrganismos isolados de amostras de mastite subclínica em búfalas mostrou que a PCR pode ser mais eficaz, levando menor tempo e maior precisão constituindo-se numa boa ferramenta de detecção de mastite.

O perfil de sensibilidade *in vitro* dos microrganismos frente aos antibióticos mostrou maior sensibilidade dos agentes antimicrobianos gentamicina e vancomicina às espécies de bactérias *Staphylococcus* spp; os antibióticos gentamicina e oxacilina ao *Streptococcus* spp. e a gentamicina às bactérias *Escherichia coli*. Esses estudos apresentam informações que, se aplicadas em programas de controle e tratamento deste problema na criação de bubalinos, poderão possibilitar aumento da produtividade do rebanho, bem como melhor qualidade do leite produzido.

Em decorrência da diversidade de agentes etiológicos envolvidos nas mastites, se constata a necessidade da utilização de exames microbiológicos e testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* como medidas para indicar o tratamento, já que o uso indiscriminado de fármacos para essa enfermidade vem aumentando a resistência desses patógenos frente aos antibióticos de uso rotineiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLAS, D.S.; LENCIONI TITTO, E.A.; FRANCO PEREIRA, A.M.; GONÇALVES TITTO, C.; DA CUNHA LEME, T.M. Comportamento de bubalinos a pasto frente a disponibilidade de sombra e água para imersão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 167-175, 2007.
- AMARAL, F.R. **Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas**. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA N.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de búfalas: composição, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.
- ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 1-7, 2001.
- ANDRADE, K.D.; NASCIMENTO RANGEL, A.; H.ARAÚJO, V.M.; LIMA JÚNIOR, D.M.; OLIVEIRA, N.A. Efeito da estação do ano na qualidade do leite de búfalas. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 33-37, 2011.
- ANDRADE, H.H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno**. 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- ANDRÉ, J.; ANDRIGHETTO, C.; BARZON STRAZZA, M.R.; CORREA, R.; GALHARDO KASBURGO, D.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P.M.R. Contagem de Células Somáticas do Leite de Búfalas Murrah Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do Leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.
- ANDRIGHETTO, C.; JORGE, A.M.; VASCONCELLOS GOMES, M.I.F.; HOCH, A.; PICCININ, A. Efeito da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, a produção

de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 641-649, 2005.

ARAÚJO, W.P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 4-9, 1998.

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

ARAÚJO, K.B.S.; RANGEL, A.H.N.; FONSECA, F.C.E.; AGUIAR, E.M.; SIMPLÍCIO, A. A.; NOVAES, L.P.; LIMA JÚNIOR, D.M. Influence of the year and calving season on production, composition and mozzarella cheese yield of water buffalo in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 6, p. 87- 91, 2012.

BALOGH, H.; RIND, R.; KALHORO, D.H.; KALHORO, A.B. Study on the incidence of mastitis in buffaloes caused by bacterial species. **Pakistan Journal of Agriculture Agricultural Engineering and Veterinary Sciences**, v. 27, n. 1, p. 83-93, 2011.

BARBERIO, A.; GIELT, H.; DALVIT, P. In vitro sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região do Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Revista Napgama**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2002.

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, n. 6, p. 98-103, 2009.

BHATIA, K.L.; & VALSA, C. Changes in buffalo lactoferrin level in milk during lactation. In: **World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP**. Proceedings... São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 159-161, 1994.

BEDOLLA CEDEÑO, C.; BEDOLLA GARCÍA E.A.; CASTAÑEDA VÁZQUEZ, H.; WOLTER W. CASTAÑEDA VAZQUEZ M.A. BKLOPPERT, B. Mastitis caprina. 2012.

BENEDETTE, M.F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.; C. SANTOS, D.A.N.; COSTA, E.A.A. Mastite bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 11, p. 1-5, 2008.

BENTLEY INSTRUMENTS. Somacount 300: operator's manual. Chaska, 1995. p.12.

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

BONINI PARDO, R.; MENDOZA-SÁNCHEZ, G.; NADER FILHO, A.; SANTOS, TAÍS A.B.; LANGONI, H.; TONHATI, H.; FERREIRA, E.B.S.; RAVENAD.L.; OLIVEIRA, M.E.A.; STURION, D.J. Microbiological evaluation of milk samples positive to California Mastitis Test in dairy buffalo cows (*Buballus bubalis*). **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 884-887, 2007.

BONNA I.C.F., SANTOS A.P.V., TEIXEIRA G.N. & MOTTA O.V. 2007. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isolados de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 117-121, 2007.

BRASIL. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 23 de outubro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 61 de 29 de dezembro de 2011a. Altera a Instrução Normativa nº 51 E dispõe sobre a Aprovação do Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.

BRITO, M.A.; BRITO, J.R.; ARCURI, E.; LANGE C.; SILVA, M.; SOUZA, G. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) Gado de Leite. Mastite. 2011b. Disponível em:

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_207_21720039247.html.
Acessado em: 02 jul. 2013.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S. PAIVA e BRITO, M.A.V .

Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 49-53, 1997.

BRITO, J.R.F. & BRITO, M.A.V.P. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente Juiz de Fora, MG: EMBRAPA-Gado de Leite, 1998. 25 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 71).

BRITO L. G.; DIAS SALMAN A.K.; RIBEIRO GONÇALES M.A.; RODRIGUES FIGUEIRÓ M. Cartilha para o produtor de leite de Rondônia Parte II: Aspectos técnicos. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**– Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007.

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

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

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

CHANDER, S. & BAXI, K. K. A note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 52, p. 847 - 849, 1975.

CHAVOSHI, M. & HUSAINI, J. Buffalo Subclinical Mastitis Bacterial Pathogens in Iran. 2012 **2nd International Conference on Biomedical Engineering and Technology IPCBEE**. vol. 34 IACSIT Press, Singapore.

CLSI 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards. Document CLSI M7-A7, CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pennsylvania.

CONSEJO NACIONAL DE MASTITIS. Consejo Nacional de Mastitis Manual de Laboratorio de mastitis bovina. Consejo Nacional de Mastitis, Madison, WI (1999).

COSTA, E.O. Resíduos de Antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-17, 1996.

COSTA, G.M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de minas gerais**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2008.

COSTA, A. C. Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia, 2010.

CUNHA NETO, O.C. **Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). 71p. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de São Paulo, Pirassununga, 2003.

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

DA SILVA, J.A.R. **Avaliação do estresse térmico em búfalas murreah criadas em dois diferentes sistemas de manejo nas condições climáticas da amazônia oriental**. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

DE JESUS BARRETO, M.L.; NASCIMENTO RANGEL, A.H.; MAIA DE ARAÚJO, V.; CAVALCANTI BEZERRA, K.; ROCHA DE MEDEIROS, H.; OLIVEIRA, J.P.F.; DIAS DE ANDARDE, K. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção,

o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.6, n. 2, p. 47–53,2010.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; KITAMURA, S.S.; FRANCO ROSENFELD, A.M.; BIRGEL E.H. et al. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1087-1092, 2004.

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

DHAKAL, I.P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 81–86, 2006.

DHAKAL, I.P.; DHAKAL, P.; KOSHIHARA, T.; NAGAHATA, H. Epidemiological and Bacteriological Survey of Buffalo Mastitis in Nepal. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 12, p. 1241–1245, 2007.

DHAKAL, I.P.; NEUPANE, M.; NAGAHATA, H. Evaluation of direct and indirect measures of quarter milk from crossbred buffaloes. **Animal Science Journal**. v. 79, p. 628–633, 2008.

D&F CONTROL SYSTEMS. Microtabsl. Disponível em [http:// browse.uk-pic.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/Products/Broad_Spectrum_Microtabs_III.htm](http://browse.uk-pic.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/Products/Broad_Spectrum_Microtabs_III.htm)
Acesso em 06 de abr. 2014

FAGIOLO, A.; & LAI, O. Mastitis in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 200-206, 2007.

FALEIRO, A.D.S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Bahia, 2013.

FANG, H. & HEDIN, G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2894–2899, 2003.

FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.

FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; URIA TORO, M.J. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “*in natura*” produzido no estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, p. 19-28, 2010.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acesso em: 17 de janeiro, 2014.

GALIERO, G. & MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, v. 1, p. 26-27, 2000.

GUERREIRO, P. K.; FRAGOSO MACHADO, M. R.; COSTA BRAGA, G.; GASPARINO E.; SILVA MARTINEZ FRANZENER. A. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 217-222, 2005.

GUSMÃO, C.A. & JORGE, A.M. Boas práticas de produção de bubalinos. Como aumentar a produção de leite em búfalas. **Circular técnica. Faculdade de Medicina e Zootecnia, Campus Botucatu**, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da pecuária Municipal, Volume 39. 2011.

JORGE, A.M.; FRANCHI VASCONCELLOS GOMES, M. I.; COLPAERT HALT, R. Efeito da utilização da somatotropina bovina recombinante (BST) sobre a produção de leite em búfalas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1230-1234, 2002.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M.R.B.; CORREA, R.C.; KASBURGO, G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P.F. Correlação entre o california mastitis test

(CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KAPRONEZAI, J. **Estudos de provas microbiológicas e celulares em amostras do leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalos bubalis*) no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2004.

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N.R. Análise microbiológica, teste de tamis e california mastites test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.72, n.2, p.183-187, 2005.

KUMAR, R. & BHATIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. Proceedings... São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. p.168-170.

KUMAR, P.A. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of bubaline mastitis directly from mastitic milk samples of buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 1643–1651, 2009.

LABORCLIN, Brasil. Sistema de identificação versão 2.4 Bactray, Instruções de uso. Produtos para Laboratórios Ltda.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; MOLERO FILHO, J. R.; BALDINI, S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Ars Veterinaria**, v. 17, n.3, p.213-217, 2001.

LAZZARI, A. M. **Mastite induzida por *Staphylococcus aureus* em bubalinos e bovinos leiteiros. Tese de doutorado em ciências animais**. Tese (Doutorado em Ciências Animais), Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Brasília, 2012.

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

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

MENDOZA-SÁNCHEZ, G.; TONHATI, H.; CERÓN-MUÑOZ, M.F.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, G. Factores ambientales que afectan el recuento de células somáticas en leche de búfalos (*Bubalus bubalis*). **Revista de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 11-22, 2009.

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

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p.57-61, 2008.

MUHAMMAD, G.; ODHI, L.A.; ATHAR, M.; REHMAN, F. Evaluation of cefhalexin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. **Indian Journal of Dairy Science**, n. 50, v. 3, p. 205-208, 1997.

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. et al. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39. p. 7-16, 1984.

MURPHY, S. Raw milk bacteria tests: standard plate count, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count. What do they mean for your farm? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, Syracuse. Proceedings. Syracuse, p.34-42, 1997.

NOGUEIRA, P.; CASSEB, A.R.; PEREIRA, C.; SILVA, S.P. Avaliação microbiológica e antibiograma da mastite subclínica em búfalas (*Buballus bubalis*) na região metropolitana de Belém-PA. **Anais do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA**, 26 à 29 de setembro de 2012.

OGALA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on milk compositional quality.

Journal of Veterinary Science, v. 8, n. 3, p.237-242, 2007.

OLIVEIRA, M.V.; MOTA, R.A.; OLIVEIRA, A.A.F.; MEIRELLES, F.S.; SILVA, F.F.

Utilização do whiteside modificado e califórnia mastites test no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.39-45, 2004.

PARANJAPPE, V.L. & DAS, A.M. Mastitis among buffalo population of Bombay: a

bacteriological report. **Indian Veterinary Journal**, n. 63, v. 6, p. 438-441, 1986.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; JÚNIOR, A.F.S. I; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos

ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 735-740, 2010.

PEREIRA JUNIOR, J.B.; FERNANDES, K.G.; MÜLLER, R.C.S.; NÓBREGA, J.A.;

PALHETA, D.C. Determinação direta DE Ca, Mg, Mn E Zn em amostras de leite de búfala da ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333-2335, 2009.

PHILPOT W.N.; & NICKERSON S.C. **Mastitis**: Counter Attack. Babson Brothers, Naperville, IL, 1-150, 1991.

RANGEL, A.H.N.; BRAGA, A.P.; AGUIAR, E.M.; LIMA JÚNIOR, D.M.; LIMA, R.N. Fatores ambientais que afetam o desempenho produtivo de rebanhos da raça Jersey. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 3, n. 3, p. 36-39 2008.

RENNÓ, F.P.; PEREIRA J.C.; VIEIRA DE ARAÚJO, C.; DE ALMEIDA TORRES, R.;

TEIXEIRA RODRIGUES, M., NAVAJAS RENNO L.; MIRANDA DE OLIVEIRA, R.F.; DA ROCHA KAISER F. Aspectos produtivos da raça pardo-suíça no Brasil. fatores de ajustamento, produção de leite e de gordura, e parâmetros genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 2043-2054, 2002.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.;

GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite

clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

ROCHA, L.A.C. **Qualidade do leite de búfala e desenvolvimento de bebida láctea com diferentes níveis de iogurte e soro de queijo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste de Bahia, Salvador, 2008.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SAINI, S.S.; SHARMA, J.K.; KWATRA, M.S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbred cows and buffaloes in Punjab. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 2, p. 103-106, 1994.

SANTOS, M.V. & FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

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

SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY, J.E.; PULKRABEK, B.J.; LIM, G.H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SHOME, B. R.; DAS MITRA, S.; BHUVANA, M.; KRITHIGA, N.; VELU, D.; SHOME, R.; ISLOOR, S.; BARBUDDHE, S. B.; RAHMAN, H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal Applied of Microbiology**, v. 111, n.6, p. 1349-1356, 2011.

SILVA, C.C.; VARGAS, G.C.; LUND, G. R.; LADEIRA, S.; GONZALES, L.H.; NASCENTE, S.P. Suscetibilidade in vitro de bactérias causadoras de mastite frente a antibióticos. **XVII Congresso de iniciação científica X Encontro de Pós-graduação**, Pelotas. 2008.

SILVA, M.V.M. & NOGUEIRA, J.L. Mastite: controle e profilaxia no rebanho bovino. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 15, p. 1-13, 2010.

SILVA, F.D.S.; COSTA, F.N.; SANTOS, N.A.F. Pesquisa de mastite clínica e subclínica e contagem de células somáticas em amostras de leite de búfalas da baixada maranhense. **XXIV Seminário de Iniciação Científica e IV Seminário de Pós-graduação: Trocando experiências, potencializando conhecimentos**. São Luis, 2012.

SIMOJOKI, H.; S. ERKKILÄ, A.; PITKÄLÄ Y.S. PYORALA. Un estudio piloto sobre el diagnóstico bacteriológico de la mastitis bovina realizadas por los veterinarios finlandeses. Página 61 en Proc. **25 ° Congreso de la Asociación Mundial de Buiatría**, Budapest, Hungría, 2008.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; De ROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1851–1865, 1997.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M.T.; PYORALA, S. Real Time Polymerase chain reaction based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2610–2617, 2009.

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.96-100, 2005.

THE EUROPEAN UNION DIRECTIVES (92/46CEE e 94/71 CEE). Conselho da União Europeia, de 16 de junho de 1992.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 10, p.1-7, 2008.

UPPAL, S.K.; SINGH, K.S.; ROY, K.S.; NAURIYAL, D.C.; BANSAL, K.B. . Natural defence mechanism against mastitis: a comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. **Buffalo Journal**, v. 10, p. 125-131, 1994.

VEIGA M. S. O uso da CCS em diferentes países - Parte 1. 2006. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/o-uso-da-ccs-em-diferentes-paises-parte-1-32730n.aspx>. Acesso em: 19 de janeiro, 2014a.

VEIGA M. S. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos - Parte 2. 2006 Disponível em: <http://m.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/efeito-da-mastite-sobre-a-qualidade-do-leite-e-dos-derivados-lacteos-parte-2-16230n.aspx>. Acesso em: 19 de janeiro, 2014b.

VERRUMA, M.; SALGADO, M.J. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Science Agrícola**, v. 51, n. 1, p. 131-137, 1994.

VIANA, R. B.; MONTEIRO, B. M.; CARDOSO, E. C.; GOUVEIA, I. M.; REZENDE, M. L. G.; ARAUJO, C. V. Avaliação da eficiência do Somaticell para o diagnóstico da contagem indireta de células somáticas no leite de búfalas. **Revista de Ciências Agrárias / Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 1, p. 24-30, 2010.

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

VIANNI, M.C.E.E. & LÁZARO, N.S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isolados de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 47-51, 2003.

VILELA J.A. & SANTINI. G.A. APRESENTACAO ORAL-Estrutura, Evolução e Dinâmica dos Sistemas Agroalimentares e Cadeias Agroindustriais UNESP/TUPÃ, TUPÃ - SP - BRASIL; 2.UNESP/TUPÃ/CEPEAGRO, TUPÃ - SP - BRASIL. A cadeia produtiva de leite de búfalas no edr de marília (sp): uma análise do segmento de produção leiteira. **48 Congresso SOBER Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural**. 25 a 28 de julho, Campo Grande-MS. 2010.

VOLTOLINI, T.V.; SANTOS, G.T.; ZAMBOM, M.A.; RIBAS, N.P.; MULLER, E.E.; DAMASCENO, J.C.; ÍTAVO, L.C.V.; VEIGA, D.R. Influência dos estágios 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**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

ANEXO 2. Ficha de controle no dia da coleta dos animais.

Projeto Avaliação, isolamento e identificação dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica em búfalas.			
Ficha de controle no dia da coleta		Fazenda:	Data:
ANIMAL	Peso do leite	Quartos	Lesões no teto
		AD	
		PD	
		AE	
		PE	
ANIMAL	Peso do leite	Quartos	Lesões no teto
		AD	
		PD	
		AE	
		PE	
ANIMAL	Peso do leite	Quartos	Lesões no teto
		AD	
		PD	
		AE	
		PE	
ANIMAL	Peso do leite	Quartos	Lesões no teto
		AD	
		PD	
		AE	
		PE	

ANEXO 3. Ficha do manejo da produção de leite da propriedade.

Ficha do manejo da produção de leite da propriedade		
Data da visita: __/__/____		Nº
Fazenda:	Hora de início da ordenha:	
	Hora de término da ordenha:	
Tempo: () seco () chuva	Nº de búfalas em lactação:	
ORDENHA		
Tipo de ordenha	Manual () Balde ao pé () Canalizado ()	
Local da ordenha	Sala de ordenha () curral () () outros	
Produção diária de leite	_____ Litros	
Os trabalhadores tem treinamento?	Sim	Não
Faz acompanhamento veterinário?	Sim	Não
Roupa diária para ordenha	Sim	Não
Faz linha de ordenha	Sim	Não
Examina os primeiros jatos do leite?	Sim	Não
Lava os tetos antes da ordenha?	Sim	Não
Seca os tetos antes da ordenha?	Sim	Não
É utilizado papel toalha para secagem dos tetos?	Sim	Não
É reutilizado?	Sim	Não
Realiza <i>pré-dipping</i> ?	Sim	Não
Realiza <i>pós-dipping</i> ?	Sim	Não
Os ordenadores usam luvas?	Sim	Não
Os ordenadores mantem as mãos limpas?	Sim	Não
O curral de espera é iluminado adequadamente?	Sim	Não
Há calcamento no curral de espera?	Sim	Não
O curral de espera é limpo (seco, sem acúmulo de esterco)?	Sim	Não
O chão da sala de ordenha é lavado frequentemente?	Sim	Não
O chão é lavado entre ordenhas?	Sim	Não
Há moscas no curral de espera, de saída e sala de ordenha?	Sim	Não
Presença de outros animais na ordenha?	Sim	Não
As búfalas se deitam após a ordenha?	Sim	Não
Faz tratamento após o secagem?	Sim	Não
Teve problemas recentes com mastite?	Sim	Não
Trata os casos clínicos?	Sim	Não
Qual produto usa?	Sim	Não

Realiza teste para mastite subclínica?	Sim	Não
Tem registros dos dados?	Sim	Não
EQUIPAMENTOS UTENSÍLIOS		
Há água para a limpeza dos equipamentos	Sim	Não
Pré-Enxuague: é utilizado água quente (40°C)?	Sim	Não
É utilizado detergente alcalino (pH>11 e cloro= 140 ppm)?	Sim	Não
Enxuague ácido; é realizada limpeza com água morna por 5 minutos com adição de detergente ácido (pH<3)?	Sim	Não
Na pré-ordenha é passada água clorada (100 a 200 ppm) por 5 minutos?	Sim	Não