

Perfil da mastite subclínica e frequência de micro-organismos isolados de búfalas mestiças (*Bubalus bubalis*)

Profile of the subclinical mastitis and frequency of microorganisms isolated from female crossbred buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Perfil de mastitis subclínica y frecuencia de microorganismos aislados de búfalos mestizos (*Bubalus bubalis*)

Recebido: 23/02/2022 | Revisado: 03/03/2022 | Aceito: 09/03/2022 | Publicado: 17/03/2022

Breno Araújo de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2277-4125>

Rede Nordeste de Biotecnologia, Brasil

E-mail: breno_melo13@hotmail.com

Sybelles Georgia Mesquita da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9318-0332>

Rede Nordeste de Biotecnologia, Brasil

E-mail: belle_mesquita21@hotmail.com

Micheline Thais dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7675-2554>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: michelinesantos@live.com

Tania Marta Carvalho dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1816-7840>

Universidade Federal de Alagoas, Brasil

E-mail: taniamarta2@gmail.com

Angelina Bossi Fraga

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6557-3000>

Rede Nordeste de Biotecnologia, Brasil

E-mail: angelina.fraga@gmail.com

Resumo

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias, sendo responsável por perdas econômicas significativas à pecuária leiteira. Objetivou-se avaliar o perfil da mastite em búfalas leiteiras e identificar os principais agentes causadores da infecção. Foram avaliadas 45 búfalas (Murrah × Jafarabadi). As búfalas com mastite clínica foram identificadas pelo teste da caneca de fundo preto, enquanto que a mastite subclínica foi detectada por *california mastitis test* (CMT) e contagem de células somáticas (CCS). Em seguida amostras de 50 mL de leite dos animais infectados foram coletadas e, posteriormente, realizada a identificação microbiológica por meios de provas bioquímicas. Os resultados mostraram que a mastite subclínica foi prevalente no rebanho estudado. No teste de CMT, 48,88% dos animais foram diagnosticados com mastite subclínica e 51,11% estavam sadios. Os quartos mamários posteriores apresentaram maior frequência de casos subclínicos (57,89%) do que os quartos anteriores (42,11%). A CCS detectou 73,33% de animais com mastite subclínica (CCS ≥ 400.000 células/mL) e 26,66% sadios (CCS < 400.000 células/mL). O leite com mastite subclínica apresentou a maior média de CCS (51,3 × 10³ células/mL) do que o leite sadio (23,9 × 10³ células/mL). A bactéria isolada com maior frequência foi do gênero *Staphylococcus* spp. (35,29%), seguido por *Streptococcus* spp. (20,00%), *Escherichia coli* (6,35%) e *Mycoplasma* spp. (4,54%). Portanto, melhorias nos cuidados sanitários para o controle da mastite subclínica em búfalas deve ser realizadas. Mais pesquisas sobre mastite em búfalas devem ser realizadas, visando auxiliar os programas de controle da mastite em búfalas.

Palavras-chave: Mastite; Búfalo; *Staphylococcus*; *California mastitis test*; Contagem de células somáticas.

Abstract

Mastitis is an inflammation of the mammary gland caused mainly by bacteria, being responsible for significant economic losses to dairy farming. The objective was to evaluate the profile of mastitis in dairy buffaloes and identify the main agents causing the infection. 45 female buffaloes (Murrah × Jafarabadi) were evaluated. Buffaloes with clinical mastitis were identified by the black bottom mug test, while subclinical mastitis was detected by the california mastitis test (CMT) and somatic cell count (SCC). Then samples of 50 mL of milk from infected animals were collected and, later, microbiological identification was performed by means of biochemical tests. The results showed that subclinical mastitis was prevalent in the herd studied. In CMT 48.88% of the animals were diagnosed with

subclinical mastitis, and 51.11% were healthy. The posterior breast quarters had a higher frequency of subclinical cases (57.89%) than the anterior quarters (42.11%). SCC detected 73.33% of animals with subclinical mastitis (SCC \geq 400,000 cells/mL) and 26.66% healthy (SCC < 400,000 cells/mL). Milk with subclinical mastitis had the highest mean SCC (51.3×10^3 cells/mL) than the healthy milk (23.9×10^3 cells/mL). The most frequent bacteria isolated was genus *Staphylococcus* spp. (35,29%), followed by *Streptococcus* spp. (20,00%), *Escherichia coli* (6,35%) and *Mycoplasma* spp. (4,54%). Therefore, improvements in health care for the control of subclinical mastitis in female buffaloes should be carried out. More research on mastitis in buffaloes should be carried out to support mastitis control programs in female buffaloes.

Keywords: Mastitis; Buffalo; *Staphylococcus*; *California mastitis test*; Somatic cell count.

Resumen

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria causada principalmente por bacterias, siendo responsable de importantes pérdidas económicas para la ganadería lechera. El objetivo fue evaluar el perfil de mastitis en búfalas lecheras e identificar los principales agentes causantes de la infección. Se evaluaron 45 búfalos (Murrah \times Jafarabadi). Los búfalos con mastitis clínica se identificaron mediante la prueba de la taza de fondo negro, mientras que la mastitis subclínica se detectó mediante la *California mastitis test* (CMT) y el Conteo de células somáticas (CCS). Luego se recolectaron muestras de 50 mL de leche de los animales infectados y, posteriormente, se realizó la identificación microbiológica mediante pruebas bioquímicas. Los resultados mostraron que la mastitis subclínica fue prevalente en el rebaño estudiado. En el CMT, 48,88% de los animales fueron diagnosticados con mastitis subclínica y 51,11% estaban sanos. Los cuartos mamarios posteriores tuvieron una mayor frecuencia de casos subclínicos (57,89%) que los cuartos anteriores (42,11%). CCS detectó un 73,33% de animales con mastitis subclínica (CCS \geq 400.000 cel/mL) y un 26,66% sanos (CCS < 400.000 cel/mL). La bacteria más frecuentes aislada era del genero *Staphylococcus* spp. (35,29%), seguida por *Streptococcus* spp. (20,00%), *Escherichia coli* (6,35%) y *Mycoplasma* spp. (4,54%). Por tanto, se deben llevar a cabo mejoras en la atención sanitaria para el control de la mastitis subclínica en búfalos. Debe llevarse a cabo más investigación sobre la mastitis en búfalos para apoyar los programas de control de mastitis en búfalos.

Palabras clave: Mastitis; Búfalo; *Staphylococcus*; *California mastitis test*; Conteo de células somáticas.

1. Introdução

O rebanho mundial de búfalos é de aproximadamente 204,3 milhões de cabeças, representando a segunda maior fonte de leite do mundo (133,7 milhões de toneladas) (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2019). O teor de gordura e proteína do leite de búfala varia de 5,60% a 7,30% e 3,80% a 4,30%, respectivamente (Ahmad et al., 2008; Sales et al., 2018; Fangmeier et al., 2019), enquanto que no leite de vaca a composição de gordura e proteína varia de 3,80% a 4,10% e 3,30% a 3,39%, respectivamente (Ahmad et al., 2008; Fangmeier et al., 2019). Devido à essas características nutricionais, o leite de búfala apresenta cerca de 50% de rendimento na produção de queijo *mozzarella* quando comparado a produção utilizando como matéria prima o leite de vaca. De acordo com Citro (2010), para produzir de 20 a 22 kg de queijo *mozzarella* bubalina são necessários cerca de 100 kg de leite de búfala, enquanto que 100 kg de leite de vaca produz entre 10 a 12 kg de queijo *mozzarella* bovina.

Entretanto, algumas doenças comprometem a saúde e o desempenho produtivo dos animais e comprometer a qualidade do leite. Dentre elas a mastite é uma das principais enfermidades de interesse econômico na bubalinocultura leiteira. A mastite é a inflamação da glândula mamária (*mast* = mama; *itis* = inflamação) causada por agentes multifatoriais (Viguiet et al., 2009). Entretanto, as bactérias são os principais agentes causadores da mastite. As bactérias patogênicas da mastite bubalina são semelhantes às isoladas na mastite bovina. Pesquisas mostram que os micro-organismos mais frequentes na mastite bubalina pertencem aos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* spp. (Vásquez-García et al., 2017; Moura et al., 2017; Dakal et al., 2018; Ottalwar et al., 2018; Bhutia et al., 2019).

A mastite pode ser classificada em dois tipos: clínica ou subclínica. A mastite clínica é caracterizada por sintomas clínicos visíveis como, edema, vermelhidão, dor na glândula mamária, presença de exsudato purulento, fibrinoso ou hemorrágico no leite (Santos et al., 2016). A mastite subclínica é assintomática, ou seja, não apresenta alterações visíveis no leite ou na glândula mamária (Viguiet et al., 2009), e devido à ausência de sinais clínicos, a detecção da mastite subclínica nos

animais torna-se mais difícil, sendo realizado por meio de testes das amostras de leite (Patel et al., 2019). Estudos mostram que as búfalas são mais predispostas à mastite subclínica, a qual pode variar de 5.46% a 70.0% nos rebanhos (Jingar et al., 2014; Ali et al., 2014; Silva et al., 2014; Moura et al., 2017; Elahia et al., 2018; Bhutia et al., 2019).

Mesmo assintomática, a mastite subclínica pode causar alterações no parênquima mamário que compromete a produção de leite (Radostits et al., 2006), aumenta a contagem de células somáticas (CCS), dos teores de Cl e Na, das proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose (Tozzetti et al., 2008), alterações no tempo de coagulação do leite, tempo de coagulação do coalho, tempo de endurecimento da coalhada e a firmeza da coalhada, comprometendo a qualidade, processamento e rendimento industrial (Tripaldi et al., 2003; Tripaldi et al., 2010). Tudo isso, provoca redução significativa da qualidade do leite e dos produtos lácteos (Khan & Khan, 2006).

Além disso, a mastite subclínica pode elevar os custos de produção (Medeiros et al., 2011), aumentar o descarte do leite contaminado, reduzir o bem-estar animal (Hillerton & Berry, 2005) e redução da *stayability* (Yalçin et al., 2000). A mastite subclínica é responsável pela redução significativa dos índices de produtividade de búfalas leiteiras em todo o mundo. Estima-se que cerca de 49% das perdas econômicas causadas por essa doença em búfalas é devido à redução da produção de leite e 37% por despesas veterinárias (Sinha et al., 2014). As perdas econômicas em rebanhos bubalinos podem chegar até US \$243.00 por fazenda ou US \$71.00 por animal (Elahia et al., 2018).

Apesar da importância econômica da espécie bubalina e para a produção de proteína de origem animal e queijos de elevada aceitação comercial, poucos são os estudos de identificação dos agentes infecciosos causadores da mastite na espécie bubalina. Portanto, a identificação das bactérias responsáveis pela mastite é um componente importante para entender e curar a doença nessa espécie (Patel et al., 2019). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a frequência dos principais agentes patogênicos envolvidos na mastite subclínica em búfalas leiteiras mestiças (Murrah × Jafarabadi).

2. Material e Métodos

2.1 Local do experimento e informações dos animais

A pesquisa foi realizada em um rebanho bubalino localizado na região Norte do Estado de Alagoas. A fazenda apresenta altitude aproximada de 10 metros, coordenadas geográficas de 9° 10'06''S e 35° 33'40''W e clima tropical chuvoso, de acordo com a classificação de Köppen. As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL). Foram utilizadas 45 búfalas mestiças (Murrah × Jafarabadi) de diferentes estágios de lactação e ordem de parto. As búfalas apresentam uma produção média de leite de 10 kg/dia e duração de lactação de 270 dias.

O sistema de manejo da fazenda consiste na realização de duas ordenhas diárias (manhã e tarde) em ordenhadeira mecânica do tipo espinha de peixe com balde ao pé em linha de vácuo canalizada e contenção com capacidade para 24 animais. Antes da ordenha as búfalas permanecem na sala de espera, onde recebem banho de chuveiro e, posteriormente, antes da entrada na sala de ordenha, são submetidas ao banho de imersão em tanque de água. Os animais são mantidos em sistema semi-intensivo em pastagem de *Brachiaria humidicula* e com oferta de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) triturada no cocho e enriquecida com uréia (10g de uréia/kg de cana). Além disso, são fornecidos suplementos minerais e rações balanceadas nas seguintes proporções: búfalas com produção entre 5 a 7,5 L de leite/dia recebem 1 kg de ração/dia e com produção entre 8 a 10,5 L de leite/dia de 2 kg de ração/dia. O manejo reprodutivo consiste em inseminação em tempo fixo (IATF).

2.2 Testes de diagnósticos de mastite

O diagnóstico da mastite clínica e subclínica dos animais em estudo foram determinados através do teste da caneca de fundo preto e *California Mastitis Test* (CMT), respectivamente, como realizado por Pizauro et al. (2014). Os testes e coletas de leite foram realizadas antes da ordenha da manhã. O teste da caneca de fundo preto consiste na ordenha manual dos três primeiros jatos de leite (aproximadamente 4 ml) de cada quarto mamário ejetados no fundo da caneca antes da ordenha e em seguida observa-se ocorrer a presença de exsudato purulento, fibrinoso ou hemorrágico o quarto mamário é classificado como positivo e registrado com valor (1) e para negativos valor (0) nos casos ausentes (Grunert, 1993). O CMT consiste na adição de 1 ml de leite de cada quarto mamário e 1 ml do reagente específico para CMT adicionados em cada compartimento da bandeja própria para CMT e em seguida são realizados movimentos circulares suaves por 60 segundos (Schalm & Noorlander, 1957). A interpretação dos resultados foi baseada na escala de pontuação em escore pelo método de Whily et al. (2005), em que os escores foram determinados em: 0 = reação negativa, 1(+) = reação moderadamente positiva, 2(++) = reação positiva e 3(+++) = reação fortemente positiva, de acordo com as características do gel formado após a reação entre o leite e o reagente, sendo classificados como animais positivos para mastite subclínicas às reações 1(+), 2(++) e 3(+++).

2.3 Contagem de células somáticas (CCS)

Após a identificação dos animais com mastite clínica ou subclínica, o leite da ordenha completa de cada búfala foi homogeneizado e em seguida amostras de 50 ml foram coletadas para a CCS do leite como realizado por Pizauro et al. (2014), com adaptações. As amostras foram coletadas em frascos estéreis contendo conservante Bronopol[®] e acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo retornável. Em seguida as amostras foram encaminhadas à Clínica do Leite – Piracicaba/SP para a realização da CCS em aparelho eletrônico Somacount 300 por citometria de fluxo como recomendados pela International Dairy Federation [IDF] (1995). Devido à falta de padronização da CCS para o leite de búfala, no presente estudo foi aplicada a CCS de 400.000 células/ml como ponto de triagem conforme Piccinini et al. (2006). Portanto, a classificação dos animais sadios ou positivos para mastite subclínica foi conduzido da seguinte forma: para animais com $CCS \leq 400.000$ células/mL = sadios e > 400.000 células/mL = positivos para mastite subclínica.

2.4 Identificação microbiológica

As amostras de leite dos quartos mamários positivos para mastite clínica e/ou subclínica foram coletadas para a isolamento e frequência dos micro-organismos. Antes da coleta foi realizada a assepsia do óstio do teto com algodão embebido com álcool à 70%, e em seguida foram coletadas 25 ml de leite em frascos estéreis. Após a coleta, as amostras foram identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo retornável e em seguida encaminhadas ao laboratório de microbiologia do CECA-UFAL. No laboratório, 25 ml das amostras foram diluídas em 225 ml de solução peptonada estéril (10^{-1}), e dessa solução foram realizadas diluições em série de 10^{-2} a 10^{-5} em tubos contendo 9 ml de água peptonada, sendo utilizadas nas posteriores análises microbiológicas.

2.4.1 Identificação de *Streptococcus* spp

Para a identificação de *Streptococcus* spp., alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-4} foram semeadas em placas de *petri*, em triplicata, em meio ágar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubadas à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h, como conduzido por Ottalwar et al. (2018), com adaptações. Para induzir um ambiente anaeróbico, as placas foram acondicionadas em jarra de cânula de vidro, contendo no centro uma vela para queima do oxigênio. Após 24 h de incubação, identificações preliminares foram realizadas, avaliando-se a morfologia das colônias, cor e tipo de hemólise no meio ágar sangue. Após a avaliação preliminar, as colônias diferentes foram subcultivadas em meio NA (*Nutrient Agar*) e incubadas à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h

para obtenção de culturas puras, como realizado por Mpatswenumugabo et al. (2017). Após a purificação, foram observadas as características morfotintoriais das colônias pelo método de Gram (Quinn, Carter, Markey & Carter, 1994). As colônias com morfologia de cocos gram-positivos (Carter, 1999) foram submetidos às provas bioquímicas da catalase, realizando esfregaços das colônias em lâminas de vidro estéreis e adicionado uma alíquota de peróxido de hidrogênio à 3%, e em seguida observado a reação de oxidação como realizado por Bhutia et al. (2019). Os *Streptococcus* spp. apresentam catalase negativa por não possuírem a enzima catalase (Smeltzer & Beenken, 2016).

2.4.2 Identificação de *Staphylococcus* spp

Os *Staphylococcus* spp. foram identificados de acordo com as análises realizadas por Bhutia et al. (2019) com algumas adaptações. As colônias em forma de cocos agrupados como cachos de uvas, gram-positivas, catalase positiva, beta e alfa-hemolíticas em meio ágar sangue foram classificadas como *Staphylococcus* spp. Para uma segunda análise de confirmação, as colônias foram subcultivadas em meio NA e incubadas à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h para obter culturas puras (Mpatswenumugabo et al., 2017). Em seguida as colônias foram subcultivadas em meio Baird Parker (Baird-Parker, 1990), específico para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, e posteriormente foram incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 a 72 h. Após esse período, as colônias foram submetidas às provas bioquímicas de coloração de Gram, características morfológicas e prova da catalase. De acordo com Smeltzer e Beenken (2016), com exceção das espécies e/ou subespécies *Staphylococcus aureus* spp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*, todas as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. possuem a enzima catalase, a qual converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água com formação de bolhas (catalase positiva).

2.4.3 Identificação de *Escherichia coli*

Para a identificação de *Escherichia coli* alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-4} foram semeadas em placas de *petri* (em triplicata) em meio ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h como conduzido por Ottalwar et al. (2018) com adaptações. Após 48 h, as colônias com coloração rósea, arredondadas, translúcidas e convexas e de aproximadamente 2 mm de diâmetro foram semeadas em meio EMB ágar (*Eosin methylene blue*) e incubadas em estufa bacteriológica à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Após 24 h, as placas que apresentaram brilho metálico foram submetidas às provas bioquímicas de coloração de Gram para observação de bacilos gram-negativos. Em seguida as colônias foram submetidas às provas bioquímicas de fermentação da glicose, Indol, produção de gás, fermentação da lactose, fermentação da fenilalanina e urease como sugerido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] (2004).

2.4.4 Identificação de *Mycoplasma* spp

Para a identificação de *Mycoplasma* spp. alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-4} foram semeadas em tubos de ensaio, em triplicata, contendo meio PPLO (*Pleuropneumonia-Like-Organisms*) sem CV enriquecido com 300ml/L de soro esterilizado e em seguida os tubos foram incubados em estufa bacteriológica à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 h (Morton, Smith & Leberman, 1951). Após esse período 0,1 mL do caldo PPLO sem CV foram inoculados, em triplicata, em placas de *petri* contendo o meio ágar PPLO e incubadas em ambiente enriquecido com CO_2 (anaerobiose) pelo método da vela em jarra de cânula de vidro à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após esse período foram observadas as características morfológicas das colônias no meio. As colônias com crescimento semelhante ao “ovo frito” foram suspeitas de *Mycoplasma* (Tortora et al., 2012), sendo em seguida semeadas em caldo PPLO sem CV enriquecido com 300ml/L de soro esterilizado e incubadas em estufa bacteriológica à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Após esse período 0,1 mL do caldo PPLO sem CV foram utilizados para as provas bioquímicas de fermentação de glicose e fermentação da arginina como sugerido pela ANVISA (2004). Esse procedimento foi repetido nos dias 4º e 5º de incubação das colônias no caldo PPLO sem CV.

2.5 Cálculos da frequência relativa (FR) e absoluta (FR)

Os cálculos da FR e FA foram realizados de acordo com Patel et al. (2019), para obter a porcentagem e o número de casos positivos de mastite e de micro-organismos presentes nas amostras de leite, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Software R® versão 3.4.6 (R core Team, 2021).

3. Resultados e discussão

3.1 Diagnóstico de mastite

O teste da caneca de fundo preto não identificou casos positivos de mastite clínica no rebanho estudado. Resultado semelhante foi registrado por Pizauro et al. (2014) ao avaliar o perfil microbiano da mastite em búfalas no Brasil, não identificaram animais positivos para mastite clínica. Por outro lado, o CMT realizado na presente pesquisa registrou 48,88% (22/45) das búfalas com mastite subclínica, as quais apresentaram algum grau de escores de CMT (1+, 2++ ou 3+++) e 51,11% (23/45) de animais sadios (score 0). A FR (48,88%) de mastite subclínica registrada pode ser considerada alta devido à infecção em quase 50% das búfalas em lactação. Resultado próximo a esse estudo foi registrado por Medeiros et al. (2013), em que registraram 42,2% de búfalas com mastite subclínicas por meio do CMT. Em estudo, Cunha et al. (2006) registraram prevalência de 41,41% de mastite subclínica e 5,47% de casos clínicos em búfalas. Por outro lado, Patel et al. (2019) encontraram 22,82% de búfalas com mastite subclínica e 7,60% com mastite clínica. Dhakal e Nagahata (2018) registraram 16% de quartos mamários com mastite subclínica e 11% com mastite clínica.

A ausência de mastite clínica na presente população amostral pode estar associada à maior predisposição de búfalas à mastite subclínica (Sharma et al., 2004; Cunha et al., 2006; Sharma et al., 2007; Ali et al., 2011; Medeiros et al., 2013; Srinivasan et al., 2013; Katsande et al., 2013; Ali et al., 2014; Moura et al., 2017). Além disso, as técnicas de controle da mastite clínica aplicadas no rebanho estudado, como a linha de ordenha, na qual após a identificação de casos clínicos os animais são tratados e ordenhados por último, e em casos de mastite clínica crônica os animais são descartados, podem contribuir para a diminuição da ocorrência da doença no rebanho. De acordo com Dhakal e Nagahata (2018), a divergência entre os resultados de CMT na literatura pode ser devido à diferença de manejo, controle de mastite e condições de higiene aplicadas nas diferentes fazendas. Ali et al. (2011) relataram que além das condições de manejo o tipo de mastite pode depender da presença ou ausência de patógenos ambientais e/ou contagiosos no ambiente e, conseqüentemente, alterando o perfil da doença nos diferentes rebanhos bubalinos.

Na presente pesquisa, do total de 180 quartos mamários avaliados pelo CMT, 88 foram positivos para mastite subclínica (escores 1+, 2++ ou 3+++) e 92 estavam sadios (score 0). Na Tabela 1 estão apresentadas as frequências de escores de CMT dos quartos mamários positivos. Resultado divergente foi registrado por Dhakal e Nagahata (2018), o qual dos 188 foram obtidos 9% de quartos mamários positivos e 85% negativos ao CMT. No presente estudo, o escore de maior frequência registrado foi o 3+++ (54,54%). O escore 3(++) é indicativo de maior grau de infecção da glândula mamária em que, quanto maior o escore, maior e mais rápida é a formação do gel de coloração roxa escura resultante da mistura do leite com o reagente CMT. Durante os movimentos giratórios a mistura tende a permanecer ao centro do compartimento da bandeja e após leve inclinação o material escurece facilmente em forma de gel (Whyte, Walmsley, Liew, Claycomb & Meinl, 2005). Por outro lado, Silva et al. (2014), registraram 42,1% de escore 1(+), 52,6% de escore 2(++) e 5,3% escore 3(+++).

Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa de búfalas com mastite subclínica de acordo com os escores de CMT.

CMT	Nº de quartos mamários	Escore CMT			Total
		1(+)	2(++)	3(+++)	
FA	180	28	12	48	88
FR(%)		31,82 (28/88)	13,63 (12/88)	54,54 (48/88)	100

1(+), reação moderadamente positiva, 2(++), reação positiva e 3(+++), reação fortemente positiva. FA - frequência absoluta, FR – frequência relativa. Fonte: Autores (2022).

Dos 22 animais positivos para mastite subclínica, 9 apresentaram um quarto mamário positivo (40,91%), 6 com dois quartos positivos (27,27%), 8 com três quartos positivos (31,82%) e não houve animais com os quatro quartos mamários positivos (0%). Em estudo, Cunha et al. (2006) também observaram maior frequência de búfalas com um quarto mamário positivo para mastite subclínica (47,17%), seguido por dois quartos (22,64%), três quartos (18,87%) e com quatro quartos mamários (11,32%). Entre os 88 quartos mamários acometidos pela mastite subclínica os quartos posteriores apresentaram a maior frequência dos casos subclínicos (57,89%), enquanto que os quartos mamários anteriores a frequência foi de 42,11%. Em estudo, Hussain, Javed, Khan & Muhammad (2013) sugeriram que búfalas com úbere profundo e formato redondo ou pendular, maior diâmetro de teto, tetos redondos e ápice do teto próximo ao chão são mais predispostas à infecção intramamária do que búfalas com o ápice do teto mais distante do chão, tetos pontiagudos e úberes menos pendulares devido às menores chances de lesões.

Em relação à detecção de mastite subclínica nos animais de acordo com o ponto de corte baseado na CCS do leite houve uma maior porcentagem de animais com a doença. Dos 45 animais avaliados 73,33% foram diagnosticados com mastite subclínica (≥ 400.000 células/mL) e 26,66% de animais sadios (< 400.000 células/mL), Tabela 2. Resultado semelhante foi registrado por Sharma et al. (2007) ao identificarem 72% de búfalas com mastite subclínica por meio da CCS do leite. Por outro lado, Ottalwar et al. (2018) identificaram prevalência de 41,51% de búfalas com mastite subclínica por meio do CCS. Em outro estudo, Silva et al. (2014) apenas 5,46% das búfalas analisadas reagiram ao CMT. As diferentes frequências de mastite subclínica entre os estudos pode ser explicada pelas diferentes condições sanitárias, ambiente e de prevalência de agentes etiológicos nos rebanhos. De acordo com Acosta et al. (2016), a mastite subclínica apresenta elevada prevalência, sendo a responsável pelas maiores perdas na indústria leiteira.

Tabela 2 - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR%) de mastite em búfalas de acordo com a contagem de células somáticas (CCS).

Diagnóstico	Sadios	Mastite subclínica	Total
CCS ($\times 10^3$ células/mL)	< 400	≥ 400	
FA	12	33	45
FR (%)	26,66 (12/45)	73,33 (33/45)	100
Média ($\times 10^3$ células/mL)	239	513	

Fonte: Autores (2022).

A média de CCS do grupo de animais sadios e com mastite subclínica no presente estudo foi de 239 e 513×10^3 células/mL, respectivamente. A CCS do grupo sadio variou de 13 a 39×10^3 células/mL, enquanto que no grupo com mastite

subclínica a CCS variou de 41 a 1800×10^3 células/mL. Esse resultado indica que o leite das búfalas com mastite subclínica apresentou maior valor de células somáticas quando comparados ao leite dos animais sadios. Ottalwar et al. (2018) registraram aumento significativo da CCS no leite de búfalas infectadas individual ($1,52$ a $3,98 \times 10^5$ células/mL) em comparação com leite de animais saudáveis ($1,00 \times 10^5$ células/mL). Dhakal e Nagahata (2018), também encontraram menor valor de CCS (134×10^3 células/mL) no leite de búfalas sadias, enquanto que nos animais com mastite subclínica o valor de CCS foi $> 200 \times 10^3$ células/mL. Moroni, Rossi, Pisoni, Bronzo, Castiglioni & Boettche, (2006) observaram que 100% dos quartos mamários de búfalas com mastite subclínica apresentaram CCS $> 200 \times 10^3$ células/mL. Por outro lado, valor maior de CCS (721.000 células/mL) foi registrado por Vásquez-García et al. (2017) no leite de búfalas com mastite subclínica. De acordo com Tizard (2014), a elevação do número de células somáticas pode ser explicado pelo aumento da migração de células de defesa para a glândula mamária com o objetivo de combater a infecção, elevando a porcentagem dessas células no leite.

A presente pesquisa registrou uma média de CCS de 239×10^3 células/mL no leite dos animais sadios. De acordo com Dhakal e Nagahata (2018), o limite de 200×10^3 células/mL do leite pode ser considerado padrão para detecção de mastite subclínica em búfalas. Entretanto, de acordo com Medeiros et al. (2011), valores baixos de CCS não implicam, necessariamente, ausência de infecção intra-mamária e que análises microbiológicas devem ser realizadas como método de detecção de mastite por identificar crescimento de agentes infecciosos no leite.

As células somáticas do leite consistem na população de leucócitos e células epiteliais oriundas da esfoliação das células alveolares da glândula mamária, cisterna mamária e cisterna dos tetos (Galiero & Morena, 2000). A composição de leucócitos que compõem as células somáticas do leite de búfalas é constituída por neutrófilos polimorfonucleares (22,48%), macrófagos (25,82%) e linfócitos (30,8%) (Hussain et al., 2012). Entretanto, a mastite reduz a síntese da glândula mamária, provocando alterações na composição do leite (Medeiros et al., 2011) e na população de leucócitos (Sahin, Yildirim, Ulutas & Ugurlutepe, 2017), principalemnte pela mastite subclínica (Khan & Khan, 2006), devido aos danos causados ao tecido parenquimatoso da glândula mamária (Radostits et al., 2006; Sharma, Singh & Bhadwal, 2011). A população de neutrófilos no leite de búfalas com mastite pode chegar à 70% do total de leucócitos do leite (Piccinini et al., 2006; Dang, Kapila, Tomar & Singh, 2007; Tripaldi et al., 2010). Esse aumento do fluxo de neutrófilos para a glândula mamária ocorre devido à rápida resposta do sistema imunológico com o objetivo de combater o mais rápido possível a infecção (Tizard, 2014). Em estudo, Medeiros et al. (2011) verificaram que no leite de búfalas com CCS de 280 a 401×10^3 células/mL houve o crescimento microbiano no leite de búfalas avaliadas, indicando a presença de infecção por agentes patogênicos. O aumento da CCS, provavelmente, ocorreu devido ao aumento da migração de células de defesa durante a infecção da glândula mamária.

Tripaldi et al. (2010) registraram alta correlação (0.70) entre CCS e porcentagem de neutrófilos polimorfonucleares no leite, indicando que quanto maior a gravidade do processo inflamatório maior será a porcentagem de neutrófilos e, consequentemente, maior a CCS do leite. Sharma et al. (2011) relatam que as células somáticas são consideradas indicativos da resistência e suscetibilidade dos animais à mastite e podem ser usadas para monitorar o nível ou ocorrência da doença nos animais individualmente e/ou coletivamente. Portanto, a CCS tem sido usada para identificar a saúde do úbere, detectar a qualidade e como bonificação no preço do leite pago aos produtores de leite de búfala (Sahin et al., 2017). Isso tudo, tem como objetivo incentivar a aplicação de técnicas de manejo adequadas por parte dos produtores de leite, como o monitoramento e controle da mastite nos rebanhos, visando produzir leite de qualidade, principalmente, pelo fato que a indústria alimentar não utiliza leite com elevada CCS ou com resíduos de antibióticos (Cobirka et al., 2020), principalmente em países desenvolvidos onde é cada vez maior as exigências para a redução desse parâmetro (Sahin et al., 2017).

A qualidade do leite deve ser considerada mais importante que a sua quantidade para a pecuária leiteira (Cobirka et al., 2020). A CCS do leite de búfala é de elevada importância para a fabricação de queijo de boa qualidade (Sale et al., 2018). Estudos mostram que a mastite afeta significativamente a qualidade e as propriedades físicas de fabricação de queijo (Tripaldi

et al., 2003; Piccinini et al., 2007; Tripaldi et al., 2010; Sharma et al., 2011; Ottalwar et al., 2018). As propriedades coagulantes do leite de búfalas como, o tempo de coagulação do coalho, o tempo de endurecimento da coalhada e a firmeza da coalhada são comprometidos com o aumento da CCS (Tripaldi et al., 2003; Tripaldi et al., 2010). Em estudo, Ottalwar et al. (2018) registraram correlação significativas entre CCS e a qualidade do leite de búfalas. Os autores encontraram aumento na porcentagem de proteína e concentração de íons de sódio no leite, enquanto observaram uma redução significativa na porcentagem de lactose. Por outro lado, Moura et al. (2017), não observaram alterações significativas na composição do leite de búfalas analisados.

Países da União Européia e a Suíça têm estabelecido valor limite de CCS no leite de búfalas de até 400.000 células/mL (Sahin et al., 2011). De acordo com Piccinini et al. (2006), o limite de 400.000 células/mL pode ser aceitável para obter padrões ideais de fabricação de queijo de búfala, uma vez que CCS acima desse valor, ocorrem mudanças significativa nos componentes do leite. O padrão da CCS para o leite bubalino ainda é uma questão divergente entre as poucas pesquisas realizadas nessa espécie. Além disso, a ausência de padrões de qualidade do leite de búfala, torna ainda mais complicado a compreensão desse tema na bubalinocultura leiteira. Portanto, esse tema carece de maior investimento em pesquisas para determinar o limite seguro de CCS no leite de búfala a ser utilizado na indústria e consumo humano.

3.2 Frequências de bactérias isoladas do leite

A mastite provoca significativa alteração na população microbiana da glândula mamária e conseqüentemente do leite. O estudo dos agentes etiológicos causadores da mastite é bastante complexa devido a gama de micro-organismos associados à doença (Patel et al., 2019). Devido à não detecção de casos de mastite clínica na população amostral nesta pesquisa, não foi possível realizar o perfil microbiológico da doença na forma clínica. Do total de 273 amostras submetidas aos exames bacteriológicos 72,9% apresentaram crescimento bacteriano. Resultado inferior (24,4%) foi registrado por Silva et al. (2014), ao avaliar o perfil microbiológico da mastite em búfalas no Brasil. Por outro lado, valores próximos foram encontrados por Pardo (2007) ao registrar 60,59% de crescimento bacteriano no leite de búfalas com mastite.

No presente estudo, 27,10% das amostras não houve crescimento bacteriano das amostras reagentes ao CMT. Valor superior foi registrado por Silva et al. (2014) ao registrar 73,7% de ausência de crescimento bacteriano nas amostras reagentes ao CMT. De acordo com os autores, quando não é possível isolar o agente causador da mastite, pode estar associado a diversos motivos, como a eliminação espontânea da infecção, a baixa quantidade de patógenos no leite, o padrão de eliminação dos micro-organismos, o não isolamento nos meios de cultura convencionais de micro-organismos mais exigentes, a localização intracelular de alguns agentes patogênicos e o uso de antibióticos pouco antes das análises bacteriológicas. Além disso, a divergência entre os resultados pode estar relacionado às diferentes condições de manejo e a prevalência de micro-organismos nos rebanhos avaliados.

As bactérias de maior frequência isoladas do leite de búfalas com mastite subclínica foram do gênero *Staphylococcus* spp. (35,29%), *Streptococcus* spp. (20,00%), seguido por *Escherichia coli* (6,35%) e *Mycoplasma* spp. (4,54%), Tabela 3. Na Figura 1 pode ser observado as características morfotintoriais de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados obtidas pela coloração de Gram (Quinn et al., 1994). A maior frequência do gênero *Staphylococcus* spp. pode ser devido à presença de patógenos menores, como os *Staphylococcus* coagulase-negativa spp., uma vez que esses micro-organismos são patógenos oportunistas, os quais normalmente causam mastite subclínica e com menor frequência mastite clínica (Radostits et al., 2006), e estão presentes na pele e nas superfícies epiteliais de todos os animais de sangue quente (Smeltzer & Beenken, 2016), como, por exemplo, colonizando o canal do teto e pele do úbere (Radostits et al., 2006). Esses micro-organismos podem causar infecção intra-mamária crônica e de menor intensidade, podendo dificultar a infecção por outros micro-organismos mais

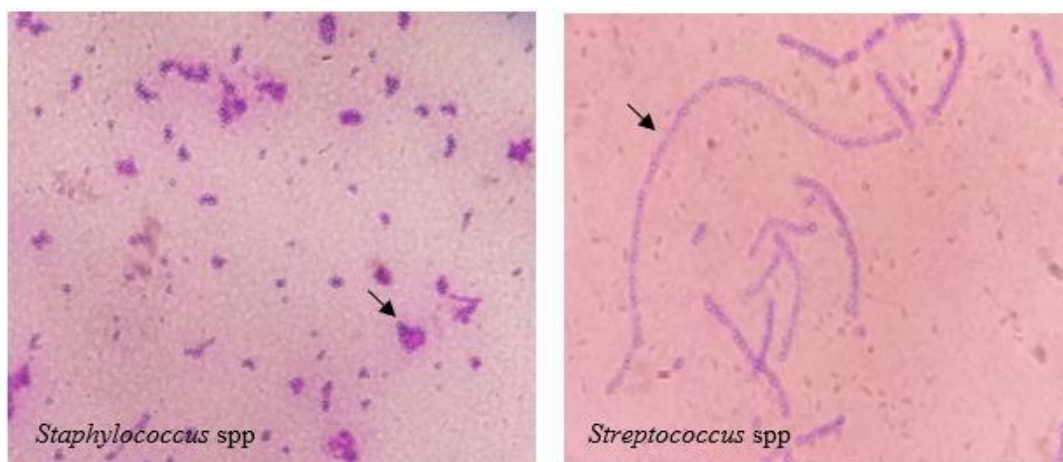
patogênicos devido à competições entre eles. Estafilococos são bactérias gram-positivas (Smeltzer & Beenken, 2016), que formam aglomerados tipicamente em forma de cacho de uva (Tortora et al., 2012), Figura 1.

Tabela 3 - Frequência relativa (FR) dos micro-organismos isolados das amostras de leite de búfalas com mastite subclínica.

Micro-organismos	FR%
<i>Staphylococcus</i> spp	35,29
<i>Streptococcus</i> spp	20,00
<i>Escherichia Coli</i>	6,35
<i>Mycoplasma</i> spp	4,54
Outros micro-organismos	6,72
Sem crescimento	27,10
Total	100,00

Fonte: Autores (2022).

Figura 1 - Características morfotintoriais das bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. obtidas pelo método de Gram. As setas (pretas) apontam as características morfológicas característicos de cada gênero. (Microscopia - Objetiva de 100).



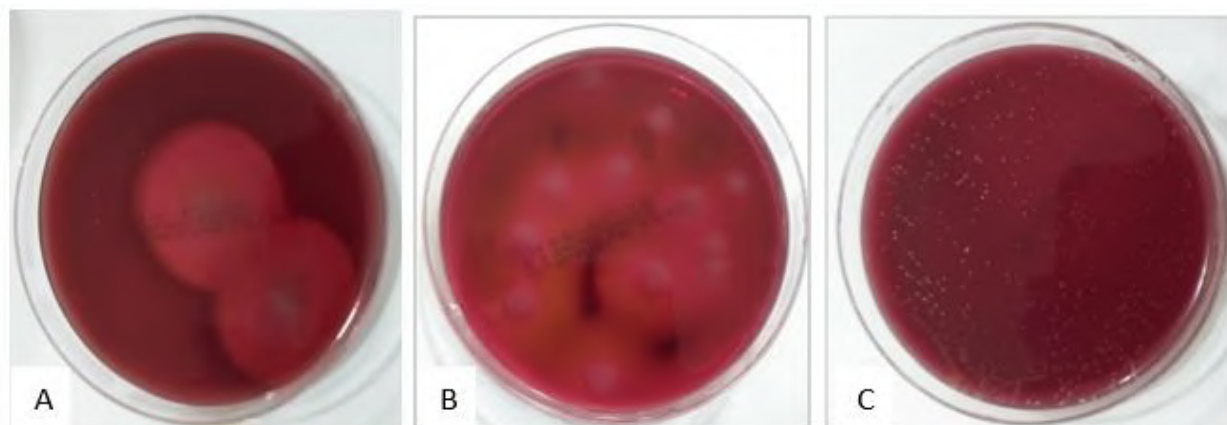
Fonte: Autores (2022).

A menor frequência de *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Mycoplasma* spp. pode ser devido que esses micro-organismos pertencem ao grupo dos patógenos maiores, os quais estão associados à mastite clínica, principalmente, por patógenos contagiosos e ambientais (Radostits et al., 2006). O gênero *Streptococcus* é formado por bactérias gram-positivas esféricas, as quais apresentam-se em cadeias, Figura 1. Esses patógenos produzem uma variedade de substâncias extracelulares que destroem as células fagocíticas, impedindo a fagocitose desses agentes. Além disso, alguma dessas enzimas produzidas são capazes de causar infecções ao digerirem o tecido conjuntivo do hospedeiro, levando a uma destruição excessiva dos tecidos (Tortora et al., 2012). Essa infecção pode causar alterações no parênquima mamário, comprometendo a síntese e a qualidade do leite (Radostits et al., 2006), provocando importantes alterações na composição do leite, como elevação da CCS, dos teores de Cl^- , Na^+ , das proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose (Tozzetti et al., 2008). Tudo isso, está associado às alterações das propriedades importantes para a produção e consumo de lácteos como, por

exemplo, o tempo de coagulação do leite, tempo de coagulação do coalho, tempo de endurecimento da coalhada e a firmeza da coalhada, comprometendo a qualidade, processamento e rendimento industrial (Tripaldi et al., 2003; Tripaldi et al., 2010).

De acordo com Tortora et al. (2012) uma importante classificação de alguns estreptococos está na aparência de suas colônias em meio ágar-sangue. Na presente pesquisa, dos 20,0% de *Streptococcus* spp isolados, 75,0% apresentaram beta-hemólise; 8,33% alfa-hemólise e 4,76% de gama-hemólise em meio ágar-sangue, Figura 2. As espécies beta-hemolíticas produzem uma enzima denominada hemolisina que causa hemólise no ágar-sangue (Tortora et al., 2012). A beta-hemólise é caracterizada pela quebra completa das hemácias, formando um halo transparente no meio ágar-sangue ao redor das colônias, geralmente, esse tipo de hemólise está associada a patógenos causadores de inflamação na glândula mamária (Smeltzer & Beenken, 2016). Fazem parte desse grupo o *Streptococcus pyogenes* e o *Streptococcus agalactiae* (Tortora et al., 2012). Já as bactérias alfa-hemolíticas realizam a quebra incompleta das hemácias, formando parcialmente um halo claro ao redor das colônias (Smeltzer & Beenken, 2016). O patógeno mais importante nesse grupo é o *Streptococcus pneumoniae* (Tortora et al., 2012). Por outro lado, as bactérias gama-hemolíticas não são capazes de quebrar as hemácias, não formam halo transparente ao redor das colônias crescidas em meio ágar sangue (Smeltzer & Beenken, 2016).

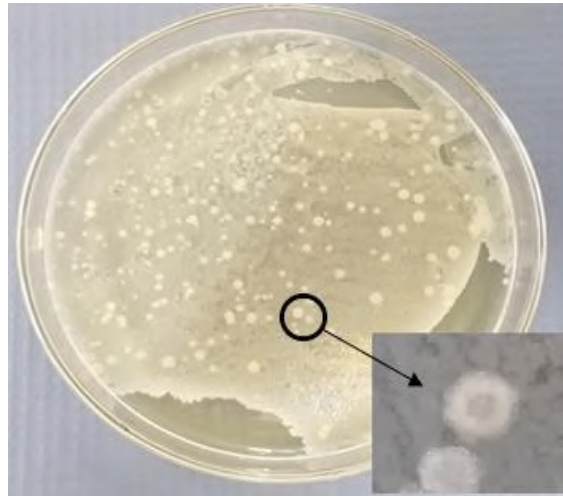
Figura 2 - Tipos de hemólise causada por *Streptococcus* spp. alfa-hemolítico (A), *Streptococcus* spp. beta-hemolítico (B) e *Streptococcus* spp. gama-hemolítico (C) em Ágar sangue isoladas do leite de búfala com mastite subclínica.



Fonte: Autores (2022).

Quanto ao *Mycoplasma* spp., são micro-organismos pleomórficos, ou seja, não possuem parede celular e podem produzir filamentos semelhante aos fungos, o que deu origem ao seu nome (*mykes* = fungos e *plasma* = formado). As colônias de micoplasmas possuem menos de 1,0 mm de diâmetro e são semelhantes à “ovo frito” (Tortora et al., 2012), Figura 3. Como pode ser observado as colônias em meio PPLO ágar apresentam o centro mais denso que as bordas menos semelhante ao ovo frito. A mastite causada por *Mycoplasma. bovis* é caracterizada pelo aumento de casos de mastite clínicas. Geralmente, as infecções provocadas por esses micro-organismos não apresentam ação terapêutica eficaz. Os sintomas são graves com múltiplos quartos infectados e redução acentuada na secreção de leite (Bushnell, 1984).

Figura 3 - Colônias de *Mycoplasma* spp. com morfologia semelhante ao “ovo frito” em meio PPLO ágar.



Fonte: Autores (2022).

Por ser um agente predominantemente proliferativo causam infiltração intersticial linfocitária associada à hiperplasia epitelial e fibrose intersticial (Santos et al., 2016). A mastite clínica causada pela *Escherichia coli* está associada a graves sintomas no hospedeiro. De acordo com Navaneethan et al. (2017), essa bactéria causa o início súbito de febre, perda de apetite, diarreia, toxemia e quarto infectado edema de quarto mamário, dor, e descarga de leite com presença de sangue e grandes coágulos grossos. Na infecção por coliformes pode ocorrer extensas áreas de infarto na glândula mamária nos casos em que o animal sobreviva à infecção (Santos et al., 2016).

Os *Staphylococcus* spp. isolados em meio Baird-Parker do leite das búfalas reagentes ao CMT apresentaram colônias de morfologia circular, pequena, cremosa e coloração preta, características específicas de *Staphylococcus aureus* spp. nesse meio, Figura 4. Apesar da prova de catalase positiva, crescimento de colônias características de *Staphylococcus aureus* em meio Baird-Parker e das característica morfotintoriais de cocos positivos em formação de cachos pelo método de Gram (Figura 1), a presente pesquisa não classificou a espécie *Staphylococcus aureus*, mas apenas o gênero *Staphylococcus* spp.

Figura 4 – Colônias de *Staphylococcus* spp. em meio Baird-Parker.



Fonte: Autores (2022).

A prevalência e os tipos de micro-organismos isolados nessa pesquisa foram diferentes aos registrados em estudo conduzido por Patel et al. (2019), no qual avaliando o perfil microbiológico do leite de búfalas com mastite subclínica na Índia, encontraram maior prevalências dos gêneros *Lactococcus* spp. (23,96%), *Staphylococcus* spp. (10,09%), *Ralstonia* spp. (12,72%), *Enterococcus* spp. (8,72%) e *Bacillus* spp. (4,29%). Em outro estudo, Silva et al. (2014) avaliando o perfil microbiológico do leite de búfalas com mastite subclínica no Brasil, registrara maior prevalência do gênero *Streptococcus* spp., seguido por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*.

Por outro lado, resultados próximos aos encontrados no presente estudo foram registrados por Ottalwar et al. (2018) os quais obtiveram maior prevalência de *Staphylococcus* spp. (39,71%) no leite de búfalas com mastite subclínica na Índia, seguido por *Escherichia coli* (25,0%), *Streptococcus* spp. (20,59%), *Pseudomonas aurigenosa* (11,76%) e *Proteus* (2,94%). Moura et al. (2017) avaliando o perfil microbiológico do leite de búfalas com mastite subclínica no Brasil, também encontraram maior frequência de *Staphylococcus* (41,0%), seguido por *Streptococcus* (32,0%), *Corynebacterium bovis* (13,6%), *Micrococcus* spp. (9,1%) e *Escherichia coli* (4,5%). Em outro estudo, Vásquez-García et al. (2017) reportaram maior prevalência para *Staphylococcus epidermidis* (17,0%) e *Staphylococcus aureus* (15,0%) no leite de búfalas com mastite subclínica no Brasil, seguido por *Bacillus* spp. (14,0%), *Acinetobacter* spp. (12,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,5%), *Shigella flexneri* (7,0%) *Streptococcus* spp. (5,5%), *Corynebacterium* spp. (5,0%), *Escherichia coli* (4,5%) e outros agentes (10,0%).

Pizauro et al. (2014) estudando os principais agentes etiológicos causadores de mastite subclínica em búfalas positivas para mastite subclínica em diferentes períodos do ano no Brasil, encontraram maior frequência de *Staphylococcus coagulase* negativa (38,4%), seguido por *Streptococcus agalactiae* (28,8%) e *Bacillus* spp. (7,56%) no período seco, enquanto que no período chuvoso os micro-organismos prevalentes foram os gêneros *Corynebacterium* spp. (23,5%), *Streptococcus* spp. (32,3%) e a espécie *Streptococcus agalactiae* (9,24%). Esse resultado pode estar associado as diferenças nas condições de clima durante os períodos do ano, alterando a população microbiana. Ainda no Brasil, Medeiros et al. (2013) estudando a etiologia da mastite em búfalas também registraram maior prevalência de *Staphylococcus* spp. (42,2%), seguido por *Corynebacterium* spp. (11,3%) e bactérias Gram-negativas (5,6%). Em outro estudo, Medeiros et al. (2011) avaliando o leite de búfalas com CCS acima de 400.000 células/mL, observaram maior frequência de *Staphylococcus coagulase* negativa (21,8%), seguido por *Corynebacterium* spp. (16,7%), bactérias Gram negativas (8,8%), *Staphylococcus coagulase* positiva (5,9%) e *Staphylococcus aureus* (1,3%).

Ali et al. (2011) estudando o perfil microbiológico do leite de búfalas com mastite subclínica na Índia, identificaram a maior prevalência dos gêneros *Staphylococcus* spp. (28,32%), seguido por *Escherichia coli* (16,18%), *Streptococcus* (7,51%), *Pseudomonas* (13,29%), *Salmonella* (7,22%), *Bacillus* (12,42%), *Klebsiella* (5,20%), *Enterococcus* (3,17%) e *Corynebacterium* (6,64%). Cunha et al. (2006) também registraram maior frequência de *Staphylococcus* spp. (20%) no leite de búfalas infectadas no Brasil. Os autores ao avaliar a frequência das bactérias nos dois tipos de mastite, observaram que os *Streptococcus* spp. nos casos clínicos eram mais frequente na mastite clínica (25%) e menor nos casos subclínicos (13,58%).

De acordo com Patel et al. (2019), a mastite subclínica apresenta uma maior diversidade de agentes patogênicos do que a mastite clínica. Isso pode justificar os diferentes agentes isolados registrados nas pesquisas citadas acima. Segundo esses autores, durante a infecção intra-mamária de búfalas a diversidade microbiana é alterada de acordo com o tipo de mastite, sendo a maior abundancia de bactérias registrada na mastite subclínica do que na clínica. De acordo com esses autores, isso pode ocorrer devido que na fase subclínica há uma prevalência de micro-organismos causadores de mastite juntamente com a flora normal, enquanto na fase clínica observa-se que apenas bactérias patogênicas dominantes que secretam os compostos de toxinas, causando a morte da flora normal e também alteram a síntese de leite da glândula. Entretanto, os estudos etiológicos da mastite subclínica em búfalas apontam que as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. são os principais

agentes patogênicos causadores dessa infecção. De acordo com Radostits et al. (2006), esse grupo é composto pelas espécies *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus epidermidis*.

Portanto, independentemente do tipo de agente patogênico responsável pela mastite, seja clínica ou subclínica, é fundamental que essa doença seja controlada e monitorada por meio de melhorias higiênicas sanitárias e a realização do diagnóstico frequente da doença nos rebanhos leiteiros. Boas práticas de ordenha como limpeza dos tetos, pré e pós-dipping, higienização dos utensílios de ordenha, principalmente, da ordenhadeira mecânica e a higiene do pessoal envolvido na ordenha são algumas medidas que podem diminuir os casos de mastite nos animais. Contudo, de acordo com Radostits et al. (2006), os agentes patogênicos causadores da mastite, continuam evoluindo à medida que novos métodos de manejo e práticas de controle dessa doença são desenvolvidas. Portanto, de acordo os autores são necessários estudos epidemiológicos frequentes com o objetivo de caracterizar os patógenos e sua associação com os animais e o ambiente. Uma vez que, de acordo com Cobirka et al., (2020), a mastite ainda é uma das principais doenças com o tratamento veterinário mais caro na produção leiteira e, é cada vez maior a pressão para evitar o uso de antibióticos nos animais.

Os resultados da presente pesquisa podem contribuir para a epidemiologia da mastite bubalina e para a importância dos métodos de detecção e controle da doença nessa espécie, além de subsidiar as práticas de manejo e controle sanitário de acordo com os principais agentes patogênicos isolados nesse estudo. Porém, mais pesquisas desse tipo devem ser conduzidas em búfalos devido à sua importância para a produção de proteína animal e para pecuária leiteira.

4. Conclusão

O diagnóstico da mastite em búfalas por meio do CCS registrou maior porcentagem de animais com mastite subclínica em comparação ao CMT. As búfalas apresentaram prevalentemente mastite do tipo subclínica. A mastite subclínica aumentou a CCS do leite, e que valores acima de 239.000 células/mL pode indicar a presença de infecção intra-mamária em búfalas leiteiras analisadas nas mesmas condições de criação e manejo do presente rebanho analisado. Entretanto, análises microbiológicas devem ser realizadas como teste confirmativo da infecção.

As bactérias de maior frequência foram do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Portanto, maiores cuidados sanitários para o controle da mastite subclínica deve ser realizados em búfalas leiteiras, principalmente, dos quartos mamários posteriores, os quais são mais predispostos a adquirir a infecção por esses agentes patogênicos.

Devido aos relevantes impactos econômicos da mastite sobre a produção de búfalas leiteiras, estudos etiológicos são fundamentais para conhecer os principais agentes patogênicos envolvidos na mastite bubalina. Dessa forma, será possível contribuir para os programas de monitoramento, controle e tratamento desta infecção. Além disso, sugerimos que futuras pesquisas contribuam para determinar os parâmetros qualitativos e nutricionais ideais para o leite de búfala como, por exemplo, os níveis adequados de CCS, contribuindo assim para a produção de leite e derivados lácteos seguros ao consumidor.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES – Brazil [001] pelo aporte financeiro.

Referências

Acosta, A. C., Silva, L. B. G., Medeiros, E. S., Pinheiro, J. W., J., & Mota, R. A. (2016). Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), 563-573.

- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. (2004). Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. 5, 1-31. http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf
- Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., Grongnet, J. F. & Gaucheron, F. (2008). Effects of acidification on physicochemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food Chemistry*, 106, 11-17.
- Ali, M. A., Ahmad, M. D., Muhammad, K., & Anjum, A. A. (2011). Prevalence of sub clinical mastitis in dairy buffaloes of Punjab, Pakistan. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(3), 477-480. <http://www.researchgate.net/publication/267785662>
- Ali, T., Rahman, A., Qureshi, M. S., Hussain, M. T., Khan, M. S., Uddin, S. & Han, B. (2014). Effect of management practices and animal age on incidence of mastitis in Nili Ravi buffaloes. *Trop Anim Health Prod* 46, 1279–1285. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0641-2>
- Baird-Parker, A. C. (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive *staphylococci*. *Journal Applied Bacteriology*, 25, 12-19.
- Bhutia, P. S., Bansal, B. K., Gupta, D. K., Singh, R. S., & Uppal, S. K. (2019). Bacterial isolation of milk samples submitted from clinical mastitis buffaloes during 2007 to 2016. *Tropical Animal Health and Production*, <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01846-w>
- Bushnell, R. B. (1984). Mycoplasma mastitis. *Veterinary Clinics of North America*, 6, 301-312.
- Carter, G. R. (1990). Isolamento e Identificação de Bactérias de Espécimes Clínicos. In G. R. Carter, & J. R. Cole (Ed.), *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology* (5a. ed., Cap. 4, pp. 19-39): Georgia, United State American: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02725-1>
- Citro, A. (2010). Classificazione dei formaggi a pasta filata e tecnologia di produzione. *AIVEMP. Newsletter*, 7(1), 8-12. <http://cms.aivemp.it/SiteTailorCommon/showBinary.aspx?id=4731>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10, 2212. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Cunha, A. P., Silva, L. B. G., Pinheiro, J. W., Jr., Silva, D. R., Oliveira, A. A. F., Silva, K. P. C. & Mota, R. A. (2006). Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arquivo do Instituto Biológico*, 1, 17-21.
- Dang, A. K., Kapila, S., Tomar, P., & Singh, C. (2007). Immunity of the Buffalo Mammary Gland during Different Physiological Stages. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 20(8), 1174 – 1181.
- Dhakar, I. P., & Nagahata, H. (2018). Evaluation of mastitis related measures and their applications to classify buffalo milk in Chitwan, Nepal. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 8, 99-111. <https://doi.org/10.17265/2161-256/2018.02.006>
- Elahia, E., Abid, M., Zhang, H., Weijun, C., & Hasson, S. U. (2018). Domestic water buffaloes: Access to surface water, disease prevalence and associated economic losses. *Preventive Veterinary Medicine*, 154, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.03.021>
- Fangmeier, M., Kemerich, G. T., Machado, B. L., Maciel, M. J., & Souza, C. F. V. (2019). Effects of cow, goat, and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. *Food Science and Technology*, 39(1), 122-128. <https://doi.org/10.1590/fst.39317>
- Food and agriculture organization of the united nations. (2019). Production and live animals. <https://www.fao.org>
- Galiero G., & Moreira, C. (2000). The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. *Bubalus Bubalis*, 6(4), 26-27.
- Grunert, E. (1993). Sistema genital feminino. In G. Dirksen, H. D. Gründer, M. R. Stöber (Ed.), *Exame Clínico dos Bovinos* (3a ed.), 269-314. Guanabara Koogan.
- Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2005). Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1250–1255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02649.x>
- Hussain, R., Javed, M. T., & Khan, A. (2012). Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. *Pakistan Veterinary Journal*, 32, 418–421.
- Hussain, R., Javed, M. T., Khan, A., & Muhammad, G. (2013). Risks factors associated with subclinical mastitis in water buffaloes in Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0421-4>
- International Dairy Federation. (1995). Milk: Enumeration of somatic cell. Brussels: IDF/FIL (IDF Standard 148 A), 8.
- Jingar, S. C., Mehla, R. K., Singh, M., Kumar, A., Kantwa, S. C., & Navav, S. (2014). Comparative study on the incidence of mastitis during different parities in cows and buffaloes. *Indian Journal of Animal Research*, 48(2), 194-197. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0555.48.2.040>
- Katsande, S., Matope, G., Ndengu, D., & Pfukenyi, D M. (2013). Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 1-7. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.523>
- Khan, M. Z., & Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. *Pakistan Veterinary Journal*. 26(4),204-208.
- Medeiros, E. S., Barbosa, S. B. P., Jatobá, R. B., Azevedo, S. S., Pinheiro, J. W., Jr., Saukas, T. N. & Mota, R. A. (2011). Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(3), 219-223.
- Medeiros, E. S., Freitas, M., Pinheiro, J., Jr., Saukas, T., Krewer, C., Santos, A. & Mota, R. (2013). Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65, 1891-1894.
- Moroni, P., Rossi, C. S., Pisoni, G., Bronzo, V., Castiglioni, B., & Boettche, P. J. (2006). Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *Journal of Dairy Science*, 89, 998-1003.

- Morton, Smith & Leberman. (1951). Gonorrhoea, and Venereal Diseases. *American Journal of Syphilis*, Vol. 35, p. 361.
- Moura, E. O., Rangel, A. H. N., Melo, M. C. N., Borba, L. H. F., Lima, D. M., Jr., Novaes, L. P. & Andrade, J. C., N. (2017). Evaluation of microbiological, cellular and risk factors associated with subclinical mastitis in female buffaloes. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 30(9), 1340-1349. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0744>
- Mpatswenumugabo, J. P., Bebora, L. C., Gitao, G. C., Mobegi, V. A., Iraguha, B., Kamana, O. & Shumbusho, B. (2017). Prevalence of Subclinical Mastitis and Distribution of Pathogens in Dairy Farms of Rubavu and Nyabihu Districts, Rwanda. *Journal of Veterinary Medicine*. 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/8456713>
- Navaneethan, S. S., Suresh, P., Ponnuswamy, K. K., & Palanivel, K. M. (2017). Prevalence of clinical mastitis due to *E. coli* in bovines. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), 405-409. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.050>
- Oliveira, C. M. C., Sousa, M. G. S., Silva, N. S., Mendonça, C. L. M., Silveira, J. A. S. & Barbosa, J. D. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(2), 104-110.
- Ottalwar, T., Roy, M., Roy, S., & Ottalwar, N. (2018). Isolation and Identification of Bacteria in Subclinical Mastitis and Effect on Composition of Buffalo Milk. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 3124-3129.
- Pardo, R. B. (2007). Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.
- Patel, R., Kunjadia, P., Koringa, P., Joshi, C., & Kunjadiya, A. (2019). Microbiological profiles in clinical and subclinical cases of mastitis in milking Jafarabadi buffalo. *Research Veterinary Science*, 125, 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.05.012>
- Piccinini, R., Miarelli, M., Ferri, B., Tripaldi, C., Belotti, M., Dapra, V. & Zecconi, A. (2006). *Journal of Dairy Research*, 73, 129-133, 2006. <https://10.1017/S0022029905001548>
- Pizauro, L. J. L., Silva, D. G., Santana, A. M., Clemente, V., Lara, G. H. B., Listoni, F. J. P. & Fagliari, J. J. (2014). Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(6), 1703-1710. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7259>
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., & Carter, G. R. (1994). Mastitis. In P.J. Quinn, M. E. Carter, B. K., Markey, & G. R., Carter (Ed.), *Clinical Veterinary Microbiology* (pp. 327-344), London: Wolfe Publishing.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses* (10a. ed., p. 1262). NY, Usa State American: Elsevier.
- Sahin A., Ulutas, Z., & Yildirim, A. (2011, 14-16 de setembro). Water Buffalo husbandry in Turkey and the world. In *VII Ulusal Zootekni Bilim Kongresi* (p. 22-26), Adana, Turkey.
- Sahin, A., Yildirim, A., Ulutas, Z., & Ugurlutepe, E. (2017). The effects of stage of lactation, parity and calving season on somatic cell counts in Anatolian Water Buffaloes. *Indian J. Anim. Res.*, 51(1),35-39. <https://www.arccjournals.com/www.ijaronline.in>
- Sales, D. C., Rangel, A. D. H. N., Urbano, S. A., Tonhati, H., Galvão, J. G. B., Jr., Guilhermino, M. M. & Bezerra, M. F. (2018). Buffalo milk composition, processing factors, whey constituents recovery and yield in manufacturing Mozzarella cheese. *Food Science and Technology*, 38(2), 328-334. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.04317>
- Santos, R. L., Nascimento, E. F., & Edwards, J. F. (2016). Sistema reprodutor Feminino. In R. L. Santos, & A. C. Alessi (Ed.). *Patologia veterinária* (2a. ed., pp. 1280-1283). Rio de Janeiro, RJ: Roca.
- Schalm, O. W., & Noorlander, D. O. (1957). Experimental and observations leading to development of the california mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130, 199-204.
- Sharma, N., Maiti, S. K., & Koley, K. M. (2004). Studies on incidence of subclinical mastitis in cattle and buffaloes of Durg area of Chhattisgarh. *Veterinary Practitioner*, 5(2), 123-124, 2004. <https://www.researchgate.net/publication/285197340>
- Sharma, N., Maiti, S. K., Sharma, K. K. (2007). Prevalence, etiology and antibiogram of microorganisms associated with subclinical mastitis in buffaloes in Durg, Chhattisgarh State (India). *Intitute. Journal of Dairy Science*. 2(2), 145-151. www.academicjournals.com
- Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 24(3), 429 – 438. <https://www.ajas.info>
- Silva, N. D. S., Silveira, J. A. S., Oliveira, C. M. C., Mendonça, C. L., Albarnaz, T. T. A., Guaraná, E. L. S. & Barbosa, J. D. (2014). Ocorrência de mastite em Búfalas (*Bubalus bubalis*) Criadas em sistema extensivo no Estado do Pará, Brasil. *Bioscience Journal*, 30(2), 839-846.
- Sinha, M. K., Thombare, N. N., & Mondal, B. (2014). Subclinical mastitis in dairy animals: Incidence, Economics, and Predisposing Factors. *The Scientific World Journal*, p. 2-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/523984>
- Smeltzer, M. S., & Beenken, E. K. (2016). Staphylococcus. In D. S. McVey, M. Kennedy, & M. M. Chengappa. (Ed.), *Microbiologia veterinária*. (3a. ed., pp. 280-304). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- Srinivasan, P., Jagadeswaran, D., Manoharan, R., Giri, T., Balasubramaniam, G. A., & Balachandran. (2013). Prevalence and etiology of subclinical mastitis among buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Namakkal, India. *Pakistan Journal of Biological Science*, 16(23), 1776-1780. <http://10.3923/pjbs.2012.1776.1780>
- Team R Core. (2008). Development R: a language and environment for statistical computing R. Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

Tizard, I. R. (2014). *Imunologia veterinária*. (9a ed.). Elsevier.

Tortora, G. J., Funk, R. B., Case, L. C. (2012). *Microbiologia* (10a ed.). Artmed. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.050>

Tozzetti, D. S., Bataier, M. B. N., Almeida, L. R. D., & Piccinin, A. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas-revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 6(10).

Tripaldi, C., Palocci, G., Miarelli, M., Catta, M., Orlandini, S., Amatiste, S. & Catillo, G. (2010). Effects of mastitis on buffalo milk quality. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 23(10), 1319-1324. www.researchgate.net/publication/261333009

Tripaldi, C., Terramoccia, S., Bartocci, S., Angelucci, M., & Danese, V. (2003). The Effects of the Somatic Cell Count on Yield, Composition and Coagulating Properties of Mediterranean Buffalo Milk. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 16(5), 738-742.

Vásquez-García, A., Silva, T. S., Queiroz, S. R. A., Godoy, S. H. S., Fernandes, A. M., Ricardo, L. M. & Franzolin, R. (2017). Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing subclinical mastitis in buffalo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(5), 447-452. <https://10.1590/S0100-736X2017000500004>

Viguer, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27, 486-493. <https://10.1016/j.tibtech.2009.05.004>

Whyte, D., Walmsley, M., Liew, A., Claycomb, R., & Mein, G. (2005). Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Research*, 72, 115-121.

Yalçın, C. (2000). Cust of mastitis in scottish dairy herds with low and high subclinical mastitis problems. *Turkish Journal Veterinary and Animal Science*, 24, 465-472.