

ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA MASTITE BUBALINA EM
REBANHOS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

RECIFE

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOCÊNCIA ANIMAL

ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA MASTITE BUBALINA EM
REBANHOS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientadora:

Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

RECIFE

2010

Ficha catalográfica

M488a Medeiros, Elizabeth Sampaio de
Aspectos epidemiológicos e caracterização dos genes de
resistência a antimicrobianos na mastite bubalina em
rebanhos na região nordeste do Brasil / Elizabeth Sampaio de
Medeiros. -- 2010.
150 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Morfofisiologia Animal, Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Mastite bubalina 2. Genes de resistência 3. Aspectos
epidemiológico I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador II. Título

CDD 636.293089819

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA MASTITE BUBALINA EM REBANHOS
NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Tese de Doutorado elaborada por

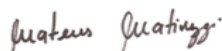
ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS

Aprovada em 14/05/2010

BANCA EXAMINADORA



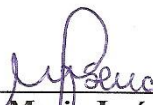
Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (Orientador)
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE



Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Colegiado de Zootecnia da UNIVASF



Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Departamento de Zootecnia da UFPB



Prof.^a Dra. Maria José de Sena
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE



Prof.^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Morfofisiologia Animal UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu orientador Prof. Rinaldo Aparecido Mota por ter contribuído para o meu crescimento como profissional e pessoa sempre com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Meu caminho não foi trilhado solitariamente e os meus acompanhantes são pessoas surpreendentes que foram enviados por Deus. Esses agradecimentos são para estas pessoas que me acompanham e auxiliam, por generosidade, amor e amizade.

Agradeço a Deus por me dar força e permitir muitos milagres em minha vida;

A minha avó Antônia Iva Sampaio “*in memorian*” por todos os ensinamentos de honestidade e amor ao próximo;

A toda minha família que torceu para esta conquista;

A minha mãe Maria da Conceição F. Sampaio e aos meus filhos Francisco Expedito Ramos Aguiar Sobrinho e Antônia Iva Sampaio Bisneta pela compreensão em todos os momentos; amo vocês;

A minha amiga Joseane por sempre cuidar tão bem das minhas crianças permitindo que eu pudesse ter tranqüilidade;

Ao meu orientador Prof. Rinaldo Aparecido Mota pelo carinho, amor, amizade e por nunca deixar de acreditar em mim;

A minha querida Dona Leiva que mesmo distante está presente em todos os momentos;

Ao meu tio Glênio Cavalcanti de Barros por todos os bons conselhos e incentivos;

Aos amigos Prof. Lêucio, Prof. Leonildo, Prof^a. Silvana Suely, Prof^a. Andrea Paiva, Prof^a. Ana Virgínia, Prof^a. Ione e Prof. Daniel por todos os bons momentos;

A minha amiga e co-orientadora, Prof^a. Manuela Freitas pelos ensinamentos, amizade e exemplo de dedicação profissional;

Ao meu amigo velho Prof. José Wilton Pinheiro Júnior e a minha amiga Prof^a. Andréa Alice por sempre estarem dispostos a me ajudar em todos os momentos;

Ao Prof. Mateus por sua contribuição, ensinamentos e exemplo de conduta ética profissional;

A Gabriel, Dona Iranir e Carina por terem sido tão acolhedores, pela confiança, amizade e carinho;

A todos do Laboratório de Bacterioses do DMV/UFRPE Erika Samiko, Erica Moraes, Andreey, Pedro, André, Orestes, Pomy, Alonso, Saulo, Eduardo, Mércia, Sineide, Sérgio, Rodolfo, Davi, Dona Guiomar;

A todos do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal em especial aos amigos de turma Helena, Flávio, Mariana, Bruno, Marliete, Roberto;

Ao Prof. Romildo coordenador do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela paciência durante todos esses anos e a Prof. Ana Porto por todo carinho e amizade;

Aos amigos do Laboratório da UNIVASF Chirles, Renatinha, Mary, Wellington, Aldo e Luciana;

Ao Programa de Gerenciamento do Rebanho Leiteiro – UFRPE pelo processamento das amostras em especial ao Prof. Benone e Raquel pela amizade;

As amigas Flaviana, Evódia e dona Salvia pelo carinho;

Aos amigos do Departamento de Microbiologia da UFRPE Rosa Galdino, Elineide, Marcos, Vitor e Norma pelo tempo bom de convivência;

Aos amigos da UFAL em Viçosa Karlinha, Wilson, Anelise, Diogo e Waldir e em especial ao meu amigo Wagner Porto por ter sido companheiro em todas as horas de alegria e de tristeza;

Aos meus amigos Maurício, Olímpio e Mauro pela energia positiva, pela força e por todos os momentos felizes;

Aos bubalinocultores das fazendas visitadas por permitirem o acesso e a coleta do leite para as análises. E por terem me acolhido tão bem;

Em especial e com muito carinho gostaria de agradecer por todos os ensinamentos ao Alberto de Gusmão Couto, grande estudioso da bubalinocultura de reconhecimento mundial. Muito obrigada pela confiança e por ter sido tão bem acolhida por toda sua família Jane, Cris, Beto e Michel;

Aos meus alunos da UFRPE dos cursos de Medicina Veterinária, Zootecnia, Agronomia e Engenharia Agrícola pelos momentos felizes que passamos;

Aos meus alunos do curso de Medicina Veterinária da UFAL em Viçosa por terem me recebido com muito carinho e confiança;

A FACEPE por ter concedido a bolsa de pesquisa que auxiliou o desenvolvimento do experimento;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho realizar um estudo epidemiológico da mastite bubalina na Região Nordeste do Brasil. Foram avaliadas quatro propriedades de exploração leiteira situadas nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia e Ceará. Os rebanhos eram constituídos de animais de diferentes idades, puros e mestiços da raça Murrah, criados em sistema intensivo ou semi-intensivo, submetidos à ordenha mecânica e encontravam-se em diferentes estágios de lactação. Na primeira etapa, foram analisadas 1896 amostras de leite de 474 búfalas utilizando o teste da caneca telada e o California Mastitis Test (CMT). Na etapa seguinte realizou-se o exame microbiológico, caracterização fenotípica e molecular dos *Staphylococcus* spp., estudo do perfil de resistência a antimicrobianos, identificação dos fatores de risco associados à mastite subclínica e relação entre a contagem de células somáticas com o exame microbiológico. Do total de 1896 amostras estudadas, 90 apresentaram mastite clínica e no CMT observou-se que 33,2% das amostras apresentaram mastite subclínica. No exame microbiológico, as bactérias mais frequentes foram *Staphylococcus* spp. seguido de *Corynebacterium* spp. e bactérias gram negativas. No teste de sensibilidade aos antimicrobianos para *Staphylococcus* spp. observou-se um percentual de resistência às drogas testadas de: 71,8% à penicilina, 49,2% à amoxicilina, 65,8% à oxacilina, 62,3% a cefquinoma, 44,7% a cephalonium, 45,2% à ciprofloxacina, 32,6% a enrofloxacina, 58,7% à eritromicina, 42,7 % ao florfenicol, 34,6% à gentamicina, 35,1% ao trimetoprim + sulfametoxazol, 8,5% à tetraciclina + neomicina + bacitracina, 43,2% à cefalotina, 38,1% à estreptomicina, 58,7% à tetraciclina, 31,6% para norfloxacina, 45,2% para ceftriaxona, 43,2% à nitrofurantoína, 57,7% a doxiciclina e 53,7% de cefalexina. Observou-se ainda resistência simultânea a quatro grupos de drogas antimicrobianas ou mais em 112/199 isolados, bem como foram detectados os genes *mecA* 11 (5,5%) e *blaZ* 79 (39,6%), bem como foi observada bomba de efluxo 47 (23,61%). O fator de risco identificado na análise multivariada considerando a Contagem de Células Somáticas (CCS) como variável dependente foi o hábito de não lavar os tetos antes da ordenha com OR= 2,68 (I.C. 1,49 – 4,83). Quando se considerou o microbiológico como variável dependente constatou-se que aquelas propriedades que

realizavam limpeza manual do equipamento de ordenha apresentaram OR= 1,85 (I.C. 1,32 – 3,64). Na análise do perfil da CCS em relação ao exame microbiológico observou-se que os animais que tiveram CCS entre 280.000 a 401.000 cel/mL foram positivos no exame microbiológico, independente do microrganismo isolado, indicando a infecção da glândula mamária. Esse estudo foi o pioneiro na região nordeste do país e os resultados aqui apresentados poderão contribuir significativamente para o estudo epidemiológico da mastite nessa espécie, além de contribuir para seu controle e profilaxia.

ABSTRACT

The aim of this research was to perform an epidemiologic study of the bubaline mastitis in the Brazilian Northeast. Four dairy farms located in the States of Pernambuco, Alagoas, Bahia and Ceará were evaluated. Herds were composed of animals at different ages and lactation stages, Murrah pure and crossbreed, raised under intensive or semi-intensive management, submitted to mechanic milking. In the first research stage, 1896 milk samples from 474 buffaloes were analyzed by using the strip-cup test and California Mastitis Test (CMT). In the following stage, the microbiologic exam, *Staphylococcus* spp. Phenotypic and molecular characterization, study of antimicrobial resistance profile and identification of risk factors associated to subclinical mastitis and the relationship among somatic cells count and microbiologic exam were performed. Out of 1896 studied samples, 90 of them presented clinical mastitis and at the CMT, 33.2% of the samples presented subclinical mastitis. In the microbiologic exam, the most frequent bacteria were *Staphylococcus* spp., followed by *Corynebacterium* spp. and Gram-negative bacteria. In the sensitivity test of *Staphylococcus* spp. to antimicrobial drugs, the observed percentage of resistance to the tested drugs were: 71.8% to penicillin, 49.2% to amoxicillin, 65.8% to oxacillin, 62.3% cefquinome, 44.7% to cephalonium, 45.2% to ciprofloxacin, 32.6% to enrofloxacin, 58.7% to erythromycin, 42.7 % to florfenicol, 34.6% to gentamicin, 35.1% to trimethoprim + sulfamethoxazole, 8.5% to tetracycline + neomycin + bacitracin, 43.2% to cephalothin, 38.1% to streptomycin, 58.7% to tetracycline, 31.6% to norfloxacin, 45.2% to

ceftriaxone, 43.2% to nitrofurantoin, 57.7% to doxycycline and 53.7% to cephalexin. In addition, it was observed simultaneous resistance to four or more antimicrobial drug groups in 112/199 isolates, as well as the detection of *mecA* 11 (5.5%), *blaZ* 79 (39.6%) genes and efflux bomb 47 (23.61%). Risk factor identified through the multivariate analysis considering the Somatic Cells Count (SCC) as the dependent variable was the custom of not washing the teats before milking with OR= 2.68 (I.C. 1.49 – 4.83). When the microbiologic exam was considered as the dependent variable, it was verified that farms which proceeded the manual cleaning of the milking equipment presented OR= 1.85 (I.C. 1.32 – 3.64). In the profile analysis of SCC in comparison to the microbiologic exam, it was observed that animals with SCC between 280,000 and 401,000 cells/mL were positive in the microbiologic exam, independent of the microorganism isolated, and indicating infection of the mammary gland. This was a pioneer study in the Brazilian Northeastern region and the results presented here may significantly contribute for the epidemiologic study of mastitis in this species, as well as contribute for its control and prophylaxis.

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Considerações Gerais sobre búfalos	17
3.2. Leite bubalino	18
3.3. Considerações gerais sobre <i>Staphylococcus</i> spp.	19
3.3.1. <i>Staphylococcus</i> spp. e a sua associação com a mastite	20
3.3.2. <i>Staphylococcus</i> spp. e sua importância para a Saúde Pública	22
3.4. Mastite Bubalina	23
3.5. Fatores de risco associados à mastite	25
3.6. Diagnóstico da mastite	27
3.7. Antimicrobianos utilizados no controle da mastite	29
3.8. <i>Staphylococcus</i> spp. e resistência mediada pelos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> e por mecanismo de bomba de efluxo.	31
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	36
5. ARTIGOS	55
ARTIGO 1. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil	55
ARTIGO 2. Antimicrobial resistance of <i>Staphylococcus</i> spp. from buffaloes mastitis in Brazil	76
ARTIGO 3. Risk factors associated to buffaloes mastitis in the Brazilian Northeast	101

ARTIGO 4. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalos na região Nordeste do Brasil	130
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
7. ANEXOS	148

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC = “American Type Culture Collection”

BHI = “brain heart infusion” – caldo cérebro coração

CCS = contagem de células somáticas

CMI = concentração mínima inibitória

CMT = “California Mastitis Test”

DNA = ácido desoxiribonucléico

EDTA = ácido etileno diamino tetraacético

h = horas

MH = “Mueller-Hinton”

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

NCCLS = “National Commitee for Clinical for Laboratory Standards” – Comitê Nacional para Padrões em Laboratório Clínico

nm = nanômetros

°C = graus Celcius

pb = pares de base

PBP = “Protein Binding Penicillin” - proteína ligadora de Penicilina

PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase

pH = potencial hidrogeniônico

rpm = rotação por minuto

S.= *Staphylococcus*

SCN = *Staphylococcus* coagulase negativa

TSA = testes de suscetibilidade a antimicrobianos

TSI = ágar tríplice açúcar ferro

U = unidades

UFC = unidades formadoras de colônia

UFRPE = Universidade Federal Rural de Pernambuco

V = volts

VP = “Voges Proskauer”

µg = micrograma

µL= microlitro

LISTA DE TABELAS

Artigos Científicos

Artigo 1

Tabela 1. Isolated microorganisms from clinical and subclinical mastitis cases in bubaline herds in Northeast of Brazil

Artigo 2

Table 1. Distribution of resistance genes according to multi drug resistance rates in *Staphylococcus* spp. from buffalo mastitis in Brazil

Artigo 3

Tabela 1 - Resultados da análise univariada para os fatores associados ou não à mastite bubalina considerando a contagem de células somáticas no leite de búfalas

Tabela 2 - Resultados da análise univariada para os fatores associados ou não à mastite bubalina considerando o exame microbiológico do leite de búfalas

Artigo 4

Quadro 1. Resultado da média de CCS frente ao exame microbiológico em amostras de leite de búfalas em propriedades no Nordeste do Brasil.

Quadro 2. Mediana e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) da contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de búfalas em propriedades no Nordeste do Brasil, segundo o resultado do cultivo microbiológico.

Quadro 3. Frequência de microorganismos isolados em leite de búfalas segundo o resultado na contagem de células somáticas no Nordeste brasileiro

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Esquema do processo de sinalização para produção de β -lactamase que inativa a penicilina

Figura 2. Complexo do gene *mec*. A estrutura de regulação do gene *mecA* é similar ao do gene *bla_Z*, que produz a β -lactamase

Artigo 2

Figure 1 - Number of resistant *Staphylococcus* spp. isolates in disk diffusion test

Figure 2 - MDR rates of *Staphylococcus* spp. isolates from Brazilian buffaloes

INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é considerado um animal de tripla aptidão, mostrando-se potencialmente adequado para a produção de leite, carne e tração devido à sua força e resistência (OLIVEIRA, 2005). Está presente em todos os estados brasileiros, constituindo-se no maior rebanho da espécie fora do continente asiático. No período de 1961 a 2005 observou-se um crescimento de 1.806%, com um rebanho atual estimado em mais de três milhões de exemplares, segundo estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2009).

Uma importante função dos bubalinos é a produção de leite e neste segmento destacam-se os países asiáticos e a Itália. No Brasil, a produção de leite de búfala e seus derivados recentemente vêm ganhando importância (TEIXEIRA et al., 2005). Bernardes (2007) afirma que a bubalinocultura está em expressiva expansão, tanto em propriedades de melhor nível tecnológico como também nas pequenas explorações. Esta espécie apresenta todas as características necessárias para uma produção de leite comercial e economicamente viável. Na Índia, já foram observadas búfalas produzindo até 31 kg de leite/dia e no Brasil não é incomum búfalas produzirem em torno de 22 kg de leite/dia (SAMARA et al., 1993).

Segundo estimativas da Federação Internacional de Laticínios (IDF, 2002), a produção mundial de leite de búfalas aumentou 48,52% no período de 1992/2002, sendo esta taxa superior ao aumento verificado na produção do leite de vaca, calculada em 8,83% no mesmo período. Estima-se que a produção mundial anual de leite de búfalas seja de 70,7 milhões de toneladas, comparados aos 501,5 milhões de toneladas de leite de vaca. A produção de leite de búfalas é concentrada em três países: Índia, Paquistão e Nepal, que respondem por 94% da produção mundial. A China e o Egito também produzem quantidades significativas de leite bubalino e no Egito a produção supera a do leite de vacas (IDF, 2000).

Embora a população brasileira não tenha o costume de consumir o leite de búfala, o produto é destinado à fabricação dos mais variados tipos de derivados lácteos como queijos (Mussarela, Frescal, Provolone e Ricota), doce de leite, requeijão, iogurtes, sorvetes e manteiga (FERREIRA, 1995). Do ponto de vista tecnológico, a

qualidade da matéria prima é um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil (OLIVEIRA et al., 1999).

Entre os fatores que podem interferir na qualidade do leite, a mastite é considerada a doença que altera de forma direta seus constituintes nutricionais. Pode causar prejuízos na rentabilidade das fazendas leiteiras decorrentes das perdas na produção quanto dos custos anuais com prevenção e tratamento. Inúmeros esforços são voltados para o seu controle e prevenção (PEDRINI e MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005; CARVALHO et al., 2007).

Na Índia, as perdas totais anuais por causa da mastite em bubalinos foram estimadas em US\$ 526 milhões (VARSHNEY e NARESH, 2004). A prevalência da mastite em búfalos no Paquistão, Iraque e Egito foi de 20,6%, 31,9% e 54%, respectivamente (VIANNI e LÁZARO, 2003). No Brasil, Vianni et al. (1990) observaram prevalência de 8,81%.

A detecção precoce da mastite em búfalos é muito importante, pois reduz as perdas na produção de leite e aumenta as chances de recuperação do animal. Com esse propósito muitos testes indiretos são utilizados para detectar alterações no leite (KUMAR e THAKUR 2001). Diversos autores relataram o Teste de Tamis, o “California Mastitis Test” (CMT), a Contagem de Células Somáticas (CCS), o Whiteside Modificado e o exame microbiológico que permite conhecer a etiologia dos microrganismos envolvidos no processo infeccioso da glândula mamária (OLIVEIRA et al., 2004; JORGE et al., 2005).

As bactérias isoladas com maior frequência em casos de mastite subclínica em bubalinos são *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Bacillus* spp (PRASAD et al., 1996). Em um estudo realizado no Estado de São Paulo, em 29,6% das amostras de leite bubalino foram isolados microrganismos sendo que em 77% delas foi isolado *Staphylococcus* spp. (GUIDO et al., 1994). *Staphylococcus* spp. também destaca-se pela capacidade de se tornar resistente a um grande número de antibióticos utilizados no tratamento das mastites em vacas (FREITAS et al., 2005).

Ferreira et al. (2006) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos e aos mecanismos de transferência de

resistência entre os microrganismos. Este fato é comumente observado em surtos de mastite.

A resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina é um sério problema de Saúde Pública, estando relacionada à presença do gene *mecA* que torna os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outros antimicrobianos (CARVALHO e BEREZIN, 2004).

A resistência pode ainda resultar da modificação do alvo do antimicrobiano ou do desvio de função daquele alvo ou pode ser causado por impermeabilidade, efluxo ou inativação enzimática. Bombas de efluxo são proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana e que são responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas (PIDDOCK, 2006; LIVERMORE, 2003).

Na região Nordeste do Brasil são escassas as referências sobre mastites em búfalas, especialmente quanto aos aspectos relacionados à etiologia, fatores de risco e perfil de sensibilidade e resistência das bactérias isoladas da glândula mamária aos antimicrobianos utilizados no tratamento e controle das mastites.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar um estudo sobre os aspectos epidemiológicos da mastite bubalina na região nordeste do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

Estudar a etiologia das mastites clínica e sub-clínica em rebanhos de búfalas leiteiras em alguns Estados da região Nordeste do Brasil;

Caracterizar o perfil de sensibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos utilizados no tratamento das mastites;

Estudar a ocorrência de determinantes de resistência microbiana como os genes *mecA*, *blaZ* e bomba de efluxo.

Identificar os fatores de risco associados à mastite subclínica em búfalas em propriedades localizadas na região Nordeste do Brasil;

Estudar o perfil da Contagem de Células Somáticas (CCS) na mastite subclínica em búfalas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Considerações gerais sobre Búfalos

Os búfalos domésticos ou búfalos asiáticos, originários da Índia, pertencem ao gênero *Bubalus*, família *Bovidae* e subfamília *Bovinae*. A espécie *bubalis* compreende animais de pele escura com baixa densidade de glândulas sudoríparas e uma epiderme espessa que propiciam dificuldades de adaptação às condições extremamente quentes e secas. Como mecanismo de sobrevivência, estes animais passaram a procurar por áreas ricas em água onde pudessem imergir e restabelecer seu conforto térmico, motivo pelo qual o *Bubalus bubalis* também é chamado de búfalo aquático (THOMAS, 2004).

O rebanho bubalino brasileiro introduzido em 1895 pela Ilha de Marajó, Estado do Pará, inclui as três raças de origem indiana (Murrah, Jafarabadi e Carabao) e a raça europeia (Mediterrâneo) (AMORIM JUNIOR et al., 2002). A entrada dos animais antes e após a primeira Guerra Mundial promoveu uma disseminação do rebanho ao longo do território nacional. O crescimento anual de 12,7% ao ano garante ao Brasil a maior população bubalina do continente americano (SILVA et al., 2003; DALMÉ, 2007), embora o número oficial de 1,174 milhões de cabeças seja muitas vezes inferior àquele encontrado na Índia (98 milhões), Paquistão (26,3 milhões) e China (22,745 milhões).

Apesar de originalmente terem sido criados e adaptados às áreas alagadas, sua melhor produtividade é obtida quando são colocados em áreas de terra firme, com água apenas para beber e disponibilidade de áreas sombreadas para regulação térmica. Nessas condições, é notável a longevidade do búfalo, havendo relato na Ásia de animais que continuaram a trabalhar com idade de até 40 anos (BARUSELLI, 1999).

Aproximadamente 62% dos búfalos brasileiros concentram-se na região Norte, que apresenta um rebanho de 728 mil búfalos, seguindo-se a região Sul onde existem 144 mil animais, a região Nordeste com 121 mil, o Sudeste com 113 mil e a região Centro-Oeste com 65 mil animais. Na região Sudeste, o Estado de São Paulo possui o maior rebanho com 71 mil animais, posicionando-se como o quinto colocado no país, acompanhado por Minas Gerais (36 mil cabeças), Rio de Janeiro (cinco mil cabeças) e Espírito Santo (600 cabeças) (FAO, 2010; IBGE, 2010). No Nordeste, a criação de

búfalos está distribuída nos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Rio Grande do Norte, Maranhão e Piauí, estimado em 106.117 cabeças (BRASIL, 2003).

Considerado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação (FAO) como o animal doméstico mais dócil do planeta, o búfalo é dotado de extrema versatilidade, podendo produzir carne, leite e trabalho, em todas as latitudes e longitudes, nas mais variadas condições climáticas, do frio da Europa Oriental aos desertos da África, nas regiões tropicais da Amazônia, nos sertões nordestinos e nas diferentes altitudes, desde as planícies às áreas montanhosas. Com todas essas características positivas, nos últimos anos essa espécie animal tem se constituído em importante fonte alternativa de produção de carne, leite e tração, principalmente para suprir as demandas dos países em desenvolvimento (SILVA et al., 2003).

3.2. Leite Bubalino

O leite bubalino apresenta características próprias que permite a sua fácil identificação físico-química e organoléptica. Possui teores de proteínas, gorduras e minerais, que superam os do leite bovino, permitindo a complementação das necessidades alimentares de crianças e adultos. Entretanto, é no seu aproveitamento industrial que se encontra a sua grande importância, por proporcionar a obtenção de produtos lácteos de boa qualidade, destacando-se os queijos, doce de leite, manteiga e iogurte (BENEVIDES, 2009).

Estima-se a produção de leite de búfala em 10,5% de todo o leite produzido no mundo. Deste montante, 92,12% são produzidos na Índia, China e Paquistão, que possuem aproximadamente 78% da população mundial de búfalos. O continente asiático é responsável por 96% da produção mundial de leite de búfala, com destaque para a Índia, onde 55% do leite produzido é de búfala (SILVA et al., 2003).

A FAO (2003) reconheceu a importância do leite da búfala devido à superioridade da composição química em relação ao de vaca. A composição físico-química do leite de búfala apresenta características próprias, que variam conforme o período da lactação, a raça e a alimentação entre outros fatores. Mas, como linha geral, apresenta densidade entre 1,025 a 1,047 g/ml; pH entre 6,41 e 6,47; acidez entre 14 a 20

°D que se deve ao elevado teor de proteínas em especial a caseína; crioscopia entre -0,531 e -0,548 °C; sólidos totais em torno de 15,64 a 17,95%, gordura variando entre 5,4 e 8%; proteína entre 3,6 e 5,26%; minerais entre 0,79 e 0,83 % (sendo até 25% deste o conteúdo de cálcio) (CUNHA NETO, 2003). Amaral (2005), em estudo realizado na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, encontrou valores semelhantes, sendo 17,21% para sólidos totais, 6,85% para gordura, 4,19% para proteínas e 4,93% para lactose.

O leite de búfala apresenta algumas peculiaridades em comparação ao leite bovino, destacando-se o sabor adocicado e a coloração branco opaca, provocada pela ausência de pigmentos carotenóides. As micelas de caseína são maiores do que as do leite de vaca fazendo com que a coalhada elaborada com este leite retenha menos água durante a ação do coalho. A concentração total de colesterol deste leite é menor do que a encontrada no leite de vaca, sendo 275 mg versus 330 mg por 100 g de gordura e é 1,5 a 1,9 vezes mais calórico. Em relação ao teor de minerais, é mais rico em Ca, 1,99 g por kg versus 1,17 g por kg e na relação do teor de Mg, 0,18g por kg versus 0,11 g por kg, porém, é mais pobre em Na, K, e Cl. Na análise de aminoácidos, o leite de búfalas apresenta 25,5% de aminoácidos essenciais a mais do que o leite de vaca (VERRUMA e SALGADO, 1994).

3.3. Considerações gerais sobre *Staphylococcus*

Ogston (1880) descreveu uma bactéria que ao microscópio apresentava-se em forma de cocos agrupados em cachos, relacionando-a a várias doenças em humanos. Em 1882, essa bactéria foi denominada *Staphylococcus*, do grego *Staphyle* – cachos de uva – e *coccus* – grãos (BAIRD PARKER, 1990).

Morfologicamente caracterizam-se como cocos Gram positivos, imóveis, apresentam metabolismo oxidativo e fermentativo, atuam sobre carboidratos com produção de ácidos e são aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer entre 7 a 48°C com temperatura ótima entre 35 a 40°C (KLOODS e LAMBE JR., 1991).

O gênero *Staphylococcus* foi separado em dois grandes grupos (coagulase positivo e coagulase negativo) com base na sua capacidade de coagular o plasma

sanguíneo pela produção de estafilocagulase. Loeb em 1903 foi o primeiro a demonstrar a capacidade do *Staphylococcus* spp em coagular o plasma, utilizando o plasma de ganso (FOSTER et al., 1997).

No gênero *Staphylococcus* spp. existem 39 espécies que são classificadas em coagulase-negativas (SCN) ou coagulase-positivas (SCP), conforme o resultado frente ao teste de coagulase. O grupo dos SCP inclui *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* e *Staphylococcus delphini* (KONEMAN et al., 2001).

Por ter um envolvimento mais frequente e um potencial patogênico maior em relação às demais espécies do gênero, *S. aureus* é classificado como “patógeno maior”, enquanto que as espécies coagulase-negativas, que em alguns rebanhos têm tido uma prevalência maior recebem a classificação de “patógenos menores” (CARDOSO et al., 1999).

3.3.1. *Staphylococcus* spp. e a sua associação com a mastite

Os *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais isolados em mastites bovinas (BRITO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; RABELLO, 2003). Nesse gênero, a espécie *S. aureus* é de maior prevalência em infecções em vacas leiteiras (BRAMLEY et al., 1996; BRITO et al., 2001).

Na espécie bubalina Kapur et al. (1992) e Muhammad et al. (1997) afirmaram ser *Staphylococcus* spp. mais frequentemente isolados nas mastites contagiosas, transmitidas quase que exclusivamente durante a ordenha, representando grande importância epidemiológica.

Animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente, permitindo a persistência de *S. aureus* durante toda a fase de lactação (FERREIRA et al., 2006). Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização do *S. aureus*. Entretanto este agente pode ser isolado em outros locais como sala de ordenha e nas teteiras das ordenhadeiras (FERREIRA et al., 2006; CUNHA et al., 2006).

S. aureus é capaz de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR et al., 2004). Vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, seja devido ao estágio da infecção ou à presença de bactérias em abscessos, além da incapacidade de defesa das células (DINIZ et al., 1998).

Com relação aos SCN, diversos estudos foram realizados quanto à prevalência destes agentes em rebanhos leiteiros. No Brasil, Pardo et al. (1998) e Laffranchi (2000) encontraram 35,29% e 68,05% de SCN, respectivamente. Em búfalas, Dhakal et al. (2006) analisaram 355 amostras de leite no Distrito de Chitwan, Nepal, e encontraram uma frequência de SCN como *S. albus* de 33,3% e *S. epidermidis* de 11,1%. As espécies coagulase negativas comumente isoladas no leite bovino são consideradas como patógenos secundários e podem causar reações inflamatórias moderadas na glândula mamária (BRAMLEY et al., 1996).

Nicolau et al. (1996) compararam a contagem de leucócitos por mililitro de leite, dos quartos mamários acometidos por estafilococos coagulase negativos com a dos acometidos por estafilococos coagulase positivos e encontraram o dobro da contagem média de leucócitos para os estafilococos coagulase positivos em relação aos coagulase negativos, caracterizando assim a resposta celular mais branda destes agentes.

3.3.2. *Staphylococcus* spp. e sua importância para a Saúde Pública

Vários estudos foram realizados no Brasil demonstrando a importância dos *Staphylococcus* ssp. produtores de enterotoxinas responsáveis por toxinfecções alimentares (FREITAS e MAGALHÃES, 1990; CARDOSO et al., 2000; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; ZSCHÖCK et al., 2004; PINHEIRO de SÁ et al., 2004; SILVA et al., 2005).

Até recentemente considerava-se que a produção de enterotoxinas era restrita ao grupo das espécies coagulase positiva principalmente o *S. aureus*, porém Valle et al. (1990) descreveram que outros estafilococos produtores de coagulase como *S. hyicus* e *S. intermedius* também possuíam essa característica. Outro estudo evidenciou que

espécies coagulase negativas como *S. xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus* também são capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais (PEREIRA et al., 2001).

A intoxicação por *Staphylococcus* pode ser descrita como um dos tipos mais comuns de doença transmissível por alimento, na qual *S. aureus* é a espécie mais frequente, pela produção de enterotoxinas préformadas em alimentos (ARCURI et al., 2006; BRANT et al., 2007). Entretanto, há relatos da detecção em alimentos, de linhagens de SCP produtores de enterotoxinas (LAMAITA et al., 2005; RAPINI et al., 2005; VERAS et al., 2008).

Além de proporcionar prejuízos à indústria leiteira, os microrganismos isolados nos casos de mastites proporcionam riscos à Saúde Pública. A intoxicação estafilocócica em humanos não é de notificação compulsória e desta forma não se pode precisar a sua real incidência. Mead et al. (1999) estimaram nos EUA a ocorrência de 185.060 casos anuais. Segundo Fagundes e Oliveira (2004), no Brasil não existem estatísticas disponíveis sobre o assunto, entretanto são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite contaminado. De acordo com estes autores *S. aureus* encontra-se amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros, sendo que a probabilidade de contaminação do leite cru com a consequente produção de enterotoxinas é elevada.

Os fatores que contribuem para a elevada frequência desses surtos incluem a baixa qualidade do leite cru, além da sua manipulação indevida desde a fazenda produtora até o comércio varejista (SENA, 2000). O período de incubação da intoxicação estafilocócica é curto, variando de 15 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado (BALABAM e RASOOLY, 2000; CARMO, 2001).

3.4. Mastite

O termo mastite designa os fenômenos inflamatórios, geralmente de natureza infecciosa que acometem a glândula mamária (BRADLEY, 2002). Segundo Le Blank et al. (2006), trata-se de uma doença que tem interrelações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos.

A doença pode apresentar-se na forma clínica ou subclínica e quanto ao agente causador pode ser do tipo contagiosa ou ambiental. Na apresentação clínica, as alterações no leite e/ou no úbere são evidentes. Na mastite subclínica, as alterações são imperceptíveis à observação visual e são necessários exames indiretos para sua constatação (COSTA, 1998; SANTOS, 2007).

A mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente é de longa duração, transformando-se em um processo infeccioso crônico e apresenta alta contagem de células somáticas (CCS). Esse tipo de mastite é causada por patógenos cujo *habitat* preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos e a transmissão ocorre principalmente durante a ordenha (COSTA, 1998; FREITAS et al., 2005).

A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, com manifestação aguda e maior ocorrência nos momentos do pré e pós-parto imediato (SANTOS e FONSECA, 2007). É causada por agentes que vivem preferencialmente no hábitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (FIGUEIREDO, 1995; FREITAS et al., 2005).

Os bubalinos apresentam os mesmos problemas sanitários que os bovinos, destacando-se a mastite que é considerada a doença que mais afeta a rentabilidade das fazendas leiteiras, tanto em termos de perdas de produção quanto dos custos anuais em prevenção e tratamento. Interfere de forma direta na qualidade do leite e inúmeros esforços são voltados para o seu controle e prevenção (PEDRINI e MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005; CARVALHO et al., 2007). É uma enfermidade de origem plurietiológica e multifatorial que acomete a maior parte do rebanho leiteiro mundial e causa problemas em toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior (COSTA, 1999).

Quando a glândula mamária encontra-se infectada, cerca de 98 a 99% das células somáticas correspondem às células de resposta inflamatória (PHILPOT e NICKERSON, 1991) Em relação aos valores das contagens de células somáticas, alguns autores têm considerado para bubalinos um valor superior a 500.000 células/ml, para

selecionar os quartos com presença ou ausência do quadro subclínico, sem necessariamente utilizarem a confirmação microbiológica (SINGH et al., 2002; SINGH, 2004; DHAKAL, 2004). Entretanto, Piccinini et al. (2006) sugeriram a contagem de 400.000 células/ml como ponto de triagem para mastite subclínica.

Ao considerar leite de conjunto, em 1994, a legislação da Comunidade Européia determinou que o leite de origem bovina, caprina, ovina ou bubalina, quando destinado ao consumo humano deve apresentar, entre outras características, uma contagem máxima de células somáticas de 400.000 células/mL (BIERENS, 1993).

Na Índia, as perdas totais anuais devido à mastite em bubalinos foi estimada em US\$ 526 milhões (VARSHNEY e NARESH, 2004).

A prevalência da mastite em bubalinos foi estimada em diferentes países, sendo que no Paquistão, Iraque e Egito esta prevalência foi de 20,6%, 31,9% e 54%, respectivamente (VIANNI e LÁZARO, 2003). No Brasil, Vianni et al. (1990) e Oliveira et al. 1997 encontraram prevalência da mastites em búfalas de 8,81% e 26,6% respectivamente.

Os agentes responsáveis pela mastite em búfalas em geral são os mesmos relatados para bovinos. Em estudo realizado no Brasil, Costa et al. (1997a) examinaram 468 amostras de leite de 14 búfalas em um período de 195 dias, submetendo-as a exames microbiológicos. Três períodos de lactação foram considerados: início (1-75 dias), meio (76-150 dias) e final (151-195 dias). Os agentes isolados em todos os estágios em ordem de frequência foram: *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. Em outro estudo, Costa et al. (1997b) estudaram 1.252 amostras de leite provenientes de 313 búfalas e encontraram 23,7% de mastite, isolando-se 59,25% de *Corynebacterium* spp., 17,59% de *Staphylococcus* spp., 12,96% de *Streptococcus agalactiae*, 2,8% de Enterobactérias e 0,9% de *Micrococcus* spp.

Oliveira et al. (2004) analisaram 196 amostras de leite de 49 búfalas na Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco. Do total de amostras estudadas, 139 (70,9%) foram positivas ao exame microbiológico. Em 76 (55%) foi isolado o *Staphylococcus* spp. sendo 18 (13%) SCP e 58 (42%) SCN. Bastonetes gram negativos 25 (18%);

Streptococcus spp 6 (8%); *Micrococcus* spp 3 (2,2%) e *Bacillus* spp 45 (32,4%) também foram identificados.

Cunha et al. (2006) e Saini et al. (1994) estudaram a prevalência da mastite bubalina e encontraram *Staphylococcus* spp. como a bactéria mais prevalente nos casos de mastite clínica e subclínica.

Langoni et al. (2001) examinaram 154 amostras de leite provenientes de 61 búfalas em lactação da raça Murrah com mastite subclínica, no município de Sarapuí, Estado de São Paulo e verificaram que o *Corynebacterium bovis* (31,3%) foi o agente isolado com maior frequência, seguido pelo *S. epidermidis* (30,1%) e *Streptococcus agalactiae* (26,5%). Os mesmos autores observaram ainda que a associação *S. epidermidis* + *Streptococcus agalactiae* (40,0%) foi mais frequente.

No Brasil, ainda são poucas informações sobre a etiologia da mastite em búfalos e a relação do impacto da doença na a qualidade do leite e seus derivados (COSTA, 1999; CUNHA NETO e OLIVEIRA, 2003).

3.5. Fatores de risco associados à mastite

Dentre os fatores predisponentes para a mastite em bovinos e muito provavelmente em bubalinos pode-se relacionar as condições climáticas, a alimentação inadequada, traumatismos, especialmente no úbere, falhas do processo de higienização e, principalmente o funcionamento inadequado da ordenhadeira. Vacas ordenhadas mecanicamente tendem a apresentar índices maior de mastite subclínica em relação às vacas ordenhadas manualmente. Falhas na higiene e manutenção dos utensílios e equipamentos de ordenha constituem as causas mais comuns de veiculação de microrganismos para o úbere (OLIVER et al., 1993; BRITO et al., 1998; SOUZA et al., 2005; COENTRÃO et al., 2008).

As falhas mais importantes em relação ao funcionamento do equipamento de ordenha são a baixa reserva de vácuo, flutuação de vácuo e o funcionamento irregular dos pulsadores. Portanto, a revisão periódica do equipamento de ordenha permite detectar e sanar oportunamente falhas que possam prejudicar seu funcionamento, eliminando assim uma das principais causas de mamite e de alterações na qualidade do

leite. As ordenhadeiras mecânicas constituem um veículo importante para diversos agentes envolvidos na mastite bovina. O funcionamento inadequado do equipamento pode determinar a infecção de quatro até seis vacas que venham a ser ordenhadas após uma vaca com infecção estafilocócica (MYLLYS et al. 1994).

Diversos procedimentos devem ser adotados durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastite que podem ser transmitidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica. Destacam-se os cuidados com a ordenhadeira, as mãos do ordenhador e lesões no teto que são considerados fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos (AMARAL et al., 2004).

Fatores associados ao manejo e características como tamanho do rebanho e tipo de ordenha (manual ou mecânica) e procedimentos durante a ordenha (não desinfecção dos tetos antes e após a ordenha), o funcionamento inadequado do equipamento de ordenha, não treinamento e motivação dos ordenhadores foram associados à ocorrência de novas infecções intramamárias em bovinos e como consequência o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite (OLIVER et al., 1993; BRITO et al., 1998; SPENCER, 2002).

Souza et al. (2005b) realizaram estudo sobre fatores de risco para mastite bovina e identificaram os fatores predisponentes para alta CCS no rebanho e para patógenos específicos da mastite. As variáveis foram a não antissepsia dos tetos após a ordenha, fornecimento de alimento após a ordenha e interações de não adoção de linha de ordenha e não antissepsia dos tetos após a ordenha + fornecimento de alimento no momento da ordenha. A não desinfecção dos tetos antes da ordenha e o não uso de água morna ou não treinamento dos ordenhadores apresentaram índices estatísticos consideráveis para o risco de doença.

3.6. Diagnóstico da Mastite

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação das alterações macroscópicas do leite e da presença de sinais da inflamação como dor e edema no

úbere. No entanto, a mastite subclínica é caracterizada pelo aumento na contagem de células somáticas (CCS), devido ao afluxo de leucócitos para a glândula uma vez que tanto o úbere quanto o leite estarão aparentemente normais. O exame bacteriológico do leite, obtido em um único quarto ou em todos os quartos mamários é o procedimento para estabelecer se o úbere está infectado. Em surtos de mastite clínica no rebanho, ou em casos individuais, o isolamento dos agentes etiológicos é o método de diagnóstico de eleição, sendo útil, no monitoramento dos mesmos (BRITO et al., 2002). O exame físico do úbere deve ser feito por palpação da glândula mamária e o momento mais adequado para esse procedimento é imediatamente após a ordenha com o úbere vazio (FONSECA e SANTOS, 2001).

O teste da caneca telada ou de fundo escuro deve ser realizado a cada ordenha nos primeiros jatos de leite. A visualização de grumos no leite decorrentes de alterações por depósito de leucócitos permite o diagnóstico da forma clínica da mastite. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce (FURLONG e RIBEIRO, 2006). Adicionalmente, os sinais clínicos da doença como edema, vermelhidão e dor podem ser observados (HIRSH e ZEE, 2003).

Para o diagnóstico da mastite subclínica, o “*California Mastitis Test*” (CMT) desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957) é um dos testes mais populares e práticos. Seu princípio baseia-se na estimativa da contagem de células somáticas no leite. Para tal, utiliza-se um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células presentes na amostra de leite e liberando o material nucléico (DNA), o qual apresenta viscosidade. Desta forma, o resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais leite e reagente, sendo o teste realizado em bandeja apropriada.

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é um critério de qualidade do leite utilizado por indústrias produtoras e entidades governamentais em todo país para indicar a saúde da glândula mamária, sendo uma ferramenta de fundamental importância para avaliar a sanidade da glândula mamária (MILK-IDF, 1995).

Em búfalas, Silva e Silva (1994) consideraram a CCS no leite normal entre 50.000 e 375.000 cel/mL, enquanto Galiero e Morena (2000) relataram valores entre 50.000 e 100.000 cel/mL. No Brasil, Ceron-Muñoz et al. (2002) ao analisarem 2.693 amostras de leite de búfalas verificaram que 80% apresentaram CCS abaixo de 70.000 cel/mL e apenas 3,2% das amostras excederam 282.000 cel/mL.

Em relação aos valores das contagens de células somáticas, para selecionar os quartos com presença ou ausência do quadro subclínico, sem necessariamente utilizar a confirmação microbiológica alguns autores têm considerado para búfalinos um valor superior a 500.000 células/ml (SINGH et al., 2002; SINGH et al., 2004; DHAKAL, 2004). Por outro lado, Piccinini et al. (2006) sugeriram a contagem de 400.000 células/ml como ponto de triagem.

O exame microbiológico é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite em ruminantes. Desse modo, medidas específicas de controle direcionadas ao controle da doença podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 1999).

Com a finalidade de se obter técnicas acuradas, rápidas e específicas para o diagnóstico da mastite bovina, métodos moleculares como PCR têm sido utilizados em diagnósticos microbiológicos (ZSCHÖCK et al., 2004). A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico, pois é altamente sensível, específica e rápida. Para se produzir um diagnóstico positivo são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis; dessa forma, as amostras inadequadamente preservadas podem ser utilizadas (LANGE et al., 1999; PHUERKTES et al., 2001).

3.7. Antimicrobianos utilizados no controle da mastite

As decisões terapêuticas são comumente realizadas de forma empírica ou baseadas em informações prévias de sensibilidade para o rebanho em questão, pois raramente os médicos veterinários dispõem de recursos como a identificação microbiana e a susceptibilidade dos agentes para se tomar decisões terapêuticas no campo (OWENS et al., 1997).

A seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal quanto da produtividade da glândula mamária. Os resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos auxiliam o veterinário na escolha do medicamento apropriado (BRAMLEY et al., 1996).

Para a melhor indicação terapêutica, o ideal é que seja feito o cultivo, o isolamento e o antibiograma do agente etiológico da mastite (LANGONI, 1995).

Os antimicrobianos mais recomendados para o tratamento da mastite são: amoxicilina, ampicilina, penicilina, cefquinoma, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, oxitetraciclina, sulfamerazida e tetraciclina (ANDREI, 1999; CUNHA et al., 2006; NUNES et al., 2007).

Utilizando a técnica da difusão em discos, Langoni et al. (1994) estudaram a sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados da glândula mamária de rebanhos bubalinos no Estado de São Paulo, observando que dentre os antimicrobianos testados, aqueles que apresentaram maior eficiência para ambos os agentes foram cloranfenicol, gentamicina e oxacilina.

Langoni et al. (2001) realizaram estudo com rebanhos bubalinos no Estado de São Paulo avaliando a sensibilidade bacteriana frente a diferentes drogas antimicrobianas e os resultados obtidos demonstraram que para *Corynebacterium bovis*, *S. epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*, a gentamicina e a oxacilina foram os antibióticos de melhor ação.

Com o objetivo de estudar o perfil de sensibilidade dos antimicrobianos aos agentes isolados em casos de mastite em rebanho bubalino no Rio Grande do Norte Cunha et al. (2006) encontraram uma boa eficácia “*in vitro*” para a gentamicina, florfenicol e enrofloxacina.

Deve-se, entretanto, considerar que nem sempre os resultados “*in vitro*” podem ser totalmente eficazes, pois vários fatores podem interferir no sucesso do tratamento tais como, uma reação tecidual de fibrose, a subdosagem e a produção de leite que diluem o medicamento e dificulta a manutenção de níveis terapêuticos, entre outros fatores (COSTA, 1998).

As infecções por bactérias multirresistentes em humanos e animais geralmente são difíceis de serem tratadas, aumentando os custos do tratamento quando comparadas às causadas por bactérias suscetíveis (AMYES e GEMMEL, 1997). No Brasil, mais de 70% das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* mostraram-se resistentes às penicilinas (COSTA et al., 1994).

Martins et al. (1998) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso frequente e indiscriminado de antibióticos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos. O surgimento de amostras de *S. aureus* multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Medeiros et al., (2009) estudaram a sensibilidade e o perfil de multirresistência antimicrobiana “*in vitro*” em vacas para isolados de *Staphylococcus* spp. e encontraram uma melhor sensibilidade para a associação entre neomicina, bacitracina e tetraciclina e um perfil de multirresistência para oito ou mais antibióticos incluindo o grupo dos betalactâmicos, gentamicina e tobramicina, enrofloxacina, ciprofloxacina e danofloxacina.

Elevada resistência a vários antimicrobianos foi relatada por Machado et al. (2008) em 109 *Staphylococcus* coagulase-negativos, em que todos os isolados foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Foi relatada elevada resistência à ampicilina (85%), à penicilina (93%), sulfonamidas (89%), novobiocina (89%), lincomicina (76%), canamicina (79%), estreptomicina, (63%), eritromicina (61%) e oxacilina (81%).

3.8. *Staphylococcus* e resistência mediada pelos genes *blaZ* e *mecA* e pelo mecanismo de bomba de efluxo

Os mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano ou aquisição de um gene de resistência de outro microrganismo, através de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003). Essas modificações no genoma dos microrganismos normalmente estão relacionadas à mudança na enzima ou estrutura alvo; mudança na

via metabólica alvo; bombas de efluxo; inativação do antibiótico por degradação do antibiótico ou inibição competitiva (PRESCOT et al., 2002).

As penicilinas pertencem à família dos antibióticos β -lactâmicos. Dois mecanismos de resistência foram descritos para *S. aureus*. O primeiro corresponde à inativação da droga pela clivagem do anel β -lactâmico. A enzima responsável, β -lactamase é codificada pelo gene *blaZ* presente em um plasmídeo (LOWY 2003). A produção dessa enzima pode ser regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1*. O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ* e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, *BlaI* se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima *BlaR1*, presente na membrana celular, clivando-a, ativando o promotor *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de β -lactamase (Figura 1) (ZHANG et al., 2001).

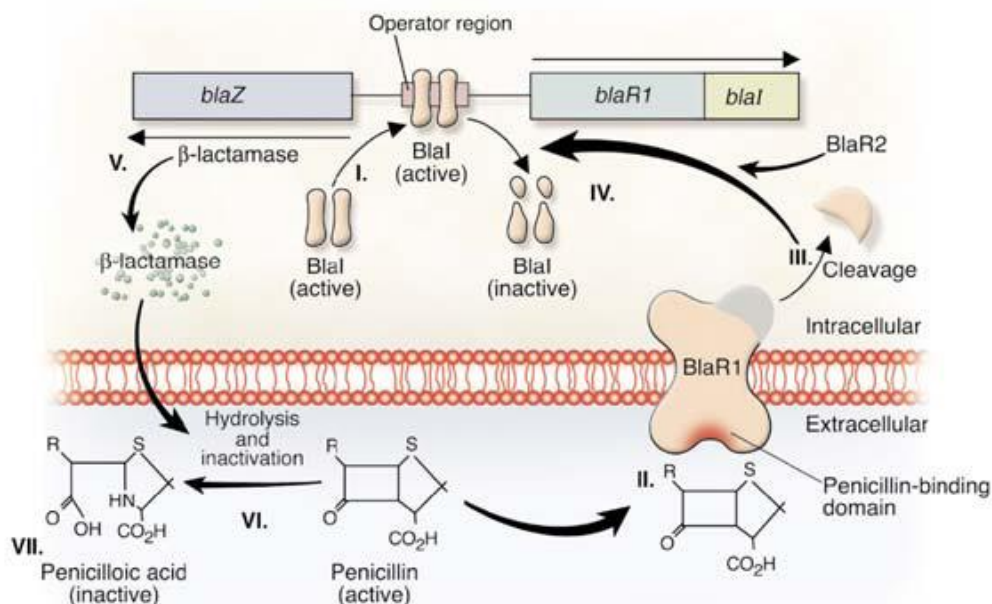


Figura 1. Esquema do processo de sinalização para produção de β -lactamase que inativa a penicilina. Fonte: (LOWY 2003).

A meticilina ou oxacilina é um antibiótico derivado semisintético da penicilina, resistente à β -lactamase. Foi introduzida na Europa em 1959 e um ano após surgiu a primeira cepa de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) (VELOZQUEZ-MEZA,

2005). Bactérias do gênero *Staphylococcus* são patógenos importantes em infecções de humanos e animais. No entanto, normalmente isolados de *S. aureus*, bem como, de animais são frequentemente resistentes a penicilinas resistentes a penicilinase, sendo classificados por conta deste tipo de resistência, como Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA). Estes microrganismos geralmente são resistentes a maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos e fluorquinolonas (BARRET, 2005).

Estudos epidemiológicos utilizando técnicas moleculares para avaliar cepas de MRSA de origem humana e animal, revelaram que possivelmente ocorre infecção cruzada entre animais e humanos e vice versa (MANIAN, 2003; VAN DUIJKEREN et al., 2004a; WEESE et al., 2006).

A oxacilina é o antimicrobiano recomendado para detectar resistência *in vitro* para meticilina em *Staphylococcus* (CLSI, 2002). A resistência à oxacilina ocorre devido à presença do gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados MRSA, denominado cassete estafilocócico do cromossomo (*mec - SCC mec Staphylococ cal Cassette Chromosomal*). O gene *mecA* codifica proteínas ligadoras de penicilina (PBP) modificadas e não tem relação com a produção de β -lactamases (ENRIGHT et al., 2002; ROHRER et al., 2003).

A meticilina mantém o sítio de ligação à enzima PBP (Proteína Ligadora de Penicilina), mas devido a uma alteração estrutural, essa droga perdeu a afinidade pela β -lactamase, evitando assim sua clivagem por bactérias produtoras dessa enzima. A PBP é responsável pela ligação cruzada entre os polímeros de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG) da parede de peptidoglicano e a inativação dessa enzima provoca o rompimento da parede celular resultando na lise da célula (LOWY, 2003).

A resistência contra essa nova geração de penicilina foi detectada menos de um ano após seu lançamento, embora seu uso clínico seja extensivo ainda nos dias de hoje. Em *S. aureus*, a estratégia de resistência para essa nova penicilina mudou da inativação da droga como acontecia através da produção de β -lactamase para alteração da enzima alvo, a PBP (ITO et al., 2003).

Cada cepa de MRSA apresenta um perfil característico da proporção de células que crescem na presença de concentrações variadas de oxacilina e de diferentes condições ambientais (MARANAN et al., 1997; LOWY, 2003). A expressão da resistência à oxacilina no *S. aureus* é regulada por genes homólogos aos reguladores do gene *blaZ*, determinante da resistência à penicilina. Esses genes (*mecI* e *mecR1*) regulam a resposta do *mecA* aos betalactâmicos de maneira similar à regulação do *blaZ* pelos genes *blaR1* e *blaI* ante a exposição à penicilina (CHAMBERS, 1997; MARANAN et al., 1997). Desta forma, a enzima PBP modificada, a PBP2a, apresenta a mesma via de sinalização da β -lactamase (Figura 1) para início de sua produção. Ou seja, o gene *mecR1*, de função homóloga ao *blaR1*, codifica um anti-repressor e o gene *mecI*, de função homóloga ao do *blaI*, codifica um repressor (Figura 2). A PBP2a possui função similar a da enzima PBP, porém com baixa afinidade às penicilinas. Dessa forma a produção da parede de peptidoglicano não é prejudicada quando a célula é exposta à droga.

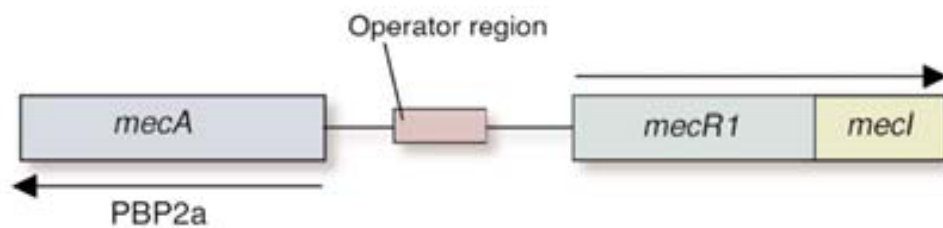


Figura 2. Complexo do gene *mec*. A estrutura de regulação do gene *mecA* é similar ao do gene *blaZ*, que produz a β -lactamase (Figura 1). Apesar da semelhança na cadeia de sinalização e do objetivo desses genes, o meio pelo qual eles conferem resistência à bactéria são muito diferentes. Fonte: Lowy (2003).

Aparentemente, a origem do gene *mecA* está relacionada a *Staphylococcus* coagulase negativos (ARCHER et al., 1994), visto que foi detectada em *S. sciuri* susceptível, uma proteína com similaridade de 80% na sequência de aminoácidos à proteína codificada pelo gene *mecA* e sua transdução ao *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA – Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*),

aumentou a resistência desse microorganismo à droga e possibilitou a detecção da produção de PBP2a (COUTO et al., 2003).

O gene *mecA* ao contrário do gene *blaZ*, está localizado no cromossomo em uma ilha genômica chamada (*SCCmec* - *Staphylococcal Cassete Chromosomal mec* ou Cassete Cromossomal *mec* de *Staphylococcus*). Oito famílias de ilhas genômicas foram identificadas em *S. aureus*, todas caracterizadas pela presença de genes de virulência com a exceção do *SCCmec* que se restringe a genes de resistência a antibióticos. Basicamente foram caracterizados quatro tipos de *SCCmec*, variando de 21 a 67 Kb (ARCHER et al., 1994).

A resistência fenotípica a oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heteroresistência fenotípica e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana é heterogeneamente resistente, assim como, todas as células carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (MARANAN et al., 1997).

Com relação ao mecanismo de resistência através da bomba de efluxo, algumas bactérias apresentam alterações na permeabilidade da membrana e mecanismos de transporte ativo que previnem o acesso de certas drogas aos seus alvos intracelulares. Isso constitui um mecanismo geral de resistência às drogas capaz de diminuir a sensibilidade a uma variedade de estruturas de drogas e compostos tóxicos. A resistência devido ao efluxo é caracteristicamente dependente de energia, seja aquela gerada pela força motora do próton ou da hidrólise do ATP (SILVA et al., 2001)

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras integrantes da membrana plasmática bacteriana e que têm sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas por estarem envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas (incluindo todas as classes de antibióticos relevantes) de dentro da célula para o meio externo (PAULSEN 2003; PIDDOCK, 2006).

Tais bombas, em geral conferem baixos níveis de resistência em consideração com os altos níveis de resistência proporcionados por mutações em genes que codificam alvos primários desses agentes (DE ROSSI et al., 2002). No entanto, bactérias que

apresentam o mecanismo de bomba de efluxo têm boa sobrevivência em um ambiente hostil (com presença de antibióticos) e bactérias que superexpressam bombas de efluxo podem ser selecionadas sem a aquisição de novo material genético (WEBBER e PIDDOCK, 2003).

Um aspecto importante relacionado às bombas é que estas podem ser específicas para um substrato ou podem transportar uma ampla gama de componentes de estrutura diferente (incluindo antibióticos de múltiplas classes). Portanto, podem estar associadas com resistência múltipla a drogas (LOMOVSKAYA e WATKINS, 2001).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalo. Textos sobre leite de búfala. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em 10 dez. 2000.

A.B.C.B, Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, disponível em: <www.bufalo.com.br>. Acesso em: 20 maio. 2009.

AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A. et al., Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 55, n. 5, 2003.

AMARAL, L.A et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, 2004

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

AMORIM JÚNIOR, A.A.; MIGLINO, M.A.; AMORIM, M.J.A.A.L. et al., Sistematização da veia cava cranial em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 306-10, 2002.

AMYES, B.G.S.; GEMMEL, C.G. Antibiotic resistance. Review article. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 46, p. 436-470, 1997.

ANDREI, E. **Compêndio veterinário**: dicionário brasileiro de medicamentos veterinários. 30. ed. São Paulo: Andrei. 1999. p.804-805.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 447-454, 1994.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; PINTO, S.M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.440-446, 2006.

BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Supp. v.19, p. 15-85, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.

BARRETT, J.F., 2005. MRSA—what is it, and how do we deal with this problem? *Expert. Opin. Ther. Targets*. 9, 253–265.

BARUSELLI, M.S. Sistemas de produção de carne e leite a pasto. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p. 143-9.

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

BIERENS, M. Stricter hygiene regulations for milk and milk products from 1994 **Unité Sciences et technologie du lait et de l'oeuf** n. 3, p. 22-3, 1993.

BOOTH, J.M. Progress in the control of mastitis. In. INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3, 1995, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Dairy Federation, 1995. p.3- 11.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRAMLEY, A.J., CULLOR, J.S., ERSKINE, R.J. et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-deminas artesanal do Serro, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1570-1574, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Estatísticas. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/index. Html](http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/index.Html) > Acesso em: agosto de 2003.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; VEIGA, V.M.O. et al. Udder infection patterns in hand and machine milked dairy herds under subtropical conditions. In:

PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998, Merida. **Proceedings...** Merida, 1998. p.148-151.

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

BRITO, J.R.F. Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 62).

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.79-82, 2002

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.347-349, 1999.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , Belo Horizonte, v. 52, p. 7-10, 2000.

CARMO, L.S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos.** 2001. 254f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARVALHO, C. E.; BEREZIN, E.M. Monitoramento microbiológico seqüencial de secreção traqueal de pacientes intubados em UTI pediátrica. **Journal Pediatric**, Rio de Janeiro, v. 81, p-23-29, 2004.

CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. 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. et al. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11 p. 2885-2889, 2002.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 781-91, 1997.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**: Approved standard. 2. ed. Wayne, PA: CLSI / NCCLS, 2002. 86 p. NCCLS document M31-A2.

COENTRÃO C.M., SOUZA G.N., BRITO J.R.F. , PAIVA B.M.A.V., LILENBAUM W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.283-288, 2008

COSTA, L. M.; RAMOS, I. B.; CARVALHO, D. G.; JÚNIOR, R. D. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. In: Programa Oficial e Resumos de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro e Infectologia, Porto Alegre, **Resumo** nº 111. p. 87, 1994.

COSTA, E.O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.O.B.; VEZON, P.; GABALDI, S.H.; BENITES, N.R.; BARUSELLI, P.S.; PASKE, A.

Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997a, Caserta. **Proceedings...** Caserta, 1997a, p. 631-4.

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

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Educação Continuada**, CRMV-SP, v.1, n.1, 1998.

COSTA, E. O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, n.2, p.16-20, 1999.

COUTO, I.; WU, S.W.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the mec A homologue native to the species. **Journal of Bacteriology**, v.185, n. 2, p. 645-653, jan. 2003.

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

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

CUNHA, A.P.; DA SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; DA SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A. DA F.; DA SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade

antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.17-21, jan./mar., 2006

DALMÉ, M.C.F. O búfalo na pequena propriedade. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 09 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>. Acesso em: 22 mar. 2010.

DE ROSSI E., ARRIGO P. B. SILVA P. E. A. MARTIN C., AÍNSA J.A. GUGLIERAME P., RICCARDI G. The Multidrug Transporters Belonging to major Facilitator Superfamily (MSF) in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Molecular Medicine** 8 (11): 714-724. 2002.

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

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

DINIZ, M.A.P.R.; BRANDÃO, S.C.C.; FARIA, E. et al. Tratamento de mastite subclínica e clínica, em vacas lactantes, com ácido acetilsalicílico, mastenzin e associação mastenzin com ácido acetilsalicílico. **Hora Veterinária**, n.18, p.27-33, 1998.

ENRIGHT MC, ROBINSON DA, RANDLE G, FEIL EJ, GRUNDMANN H, SPRATT BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(11):7687-92. 2002.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 34, n.4, p. 1315-1320, 2004.

FAO. Disponível em www.fao.org. Acesso em 24 janeiro 2010. Rebanho bubalino brasileiro. Brasília, DF: MAPA/IBGE, 26 nov. 2003. Disponível em <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 24 de janeiro de 2010

FERREIRA, T. A.; GUINART, T. C.; LAICINI, Z. M.; MURTA, P. H. G. Características do leite de búfala e seus derivados. **Leite & Derivados**, v.8 n.22, p.16-20, 1995.

FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1228-1234, 2006.

FIGUEIREDO, J. B. Mastite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1995. p 176.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2001, 175p.

FOSTER, G. et al. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., New Coagulase-positive Species isolated from otters. **International Journal of Bacteriology**, Whashington, US, v.47, n.3, p.724-726, 1997.

FREITAS, M. MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Stanphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Reviews Microbiology**, v. 21, p. 315, 1990.

FREITAS, M.F.L. et. al. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FURLONG, J.; RIBEIRO, A. C. C. L. Controle da Mastite. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [MAPA]. EMBRAPA. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_71_21720039240.html>. Acesso: nov. 2009.

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

GUIDO, M. C.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; COSTA, E. O. Female bubaline mastitis etiology in brazilian state of São Paulo in Congresso Nazional Sull Állevamento Del Búfalo, 1994 Trabalhos apresentados SI Sn 1994 CD-ROM

HIRSH, E.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro: Brasil, 2003. 446p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados – Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 mar. 2010-04-16.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk production: the world dairy situation 2000. **Bulletin of International of Dairy Federation**. Document 355. p. 5-6. 2000.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Statistics: the world dairy situation 2002. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Document 378. p. 46-47. 2002.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA X.X.; YUZAWA, H; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island **Drug Resistance Updates**, vol. 6, n.1, p. 41-52, fev. 2003.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R.; CORREA, B. R. C.; KASBURGO, D. 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.

KAPUR, M.P.; ANSHUSHARMA, R.; BHARDWAL, R.M. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v.11, n.2, p. 42-47, 1992.

KLOSS, W. E.; LAMBE, JR., D. W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, **A Manual of Clinical Microbiology**. 5ed. Washington, D. C.:Am. Soc. Microbiol., 1991. p.1500-1510.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN-JR., W.C. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido – 5ª Edição. Belo Horizonte – MG: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001, 1465p.

KUMAR, P. THAKUR, D. K. Comparative efficacy of indirect test for the detection of mastitis in buffaloes Indian **Veterinary Journal** v. 78, p. 801-803, 2001.

LAFFRANCHI, A. **Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação**. 2000. 37f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do

choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.702-709, 2005.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.67, p.127-141, 1999.

LANGONI, H.; CARVALHO, M. C. M. de; MISCHAN, M. M. Incidência da mastite bovina relacionada com o estágio de lactação. **Revista Brasileira de Veterinária**, v. 16, p. 10-15, 1994.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública**. Botucatu, SP. 1995. 200p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

Le BLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F. et al. Major advances in diseases prevention in dairy cattle **Journal of Dairy Sciences**, V. 89 n.4 p. 1267-1279. 2006.

LIVERMORE, D. L. 2003. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 51(Suppl. 2):9-16

LOMOVSKAYA O. and WATKINS W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 3(2): 225-236 2001.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.9, p. 1265-1273, mai 2003.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.278-282, 2008.

MANIAN, F.A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. **Journals Clinical Infectious Disease** 36, E26-E28, 2003.

MARANAN, M.C. et al. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics**, v. 11, p. 813-49, 1997.

MARTINS, S.C.S.; FELIX, P. R. ; NASCIMENTO, G. G. F. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. **Higiene Alimentar** Piracicaba, v.12, n.56, p.45-48, 1998.

MEAD, P.S., SLUTSKER L., DIETZ V., et al. 1999. "Food-related illness and death in the United States." **Emerging Infectious Diseases**. 5:607- 625.

MEDEIROS, E. S., MOTA, R. A., SANTOS, M. V. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica **Pesquisa Veterinária Brasileira** 29(7):569-574, julho 2009

MILK: enumeration of somatic cells. Bulletin of international dairy federation. N. 148A, 8p. 1995.

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

MYLLYS, V.; HOKANEN-BUZALSKI, T.; HUOVINEN, P.; SANDHOLM, M. NURMI, E. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. **Acta Veterinaria Scandinavica.**, v.35, n.4, p.363-369, 1994.

NICOLAU, E. S. et al. Influencia da mastite subclínica estafilococica sobre as características físico químicas e celulares do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v.16, n.1, p.35 – 38, 1996.

NUNES S. F., CAVACO L. M., VILELA C. L., BEXIGA R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária** 102 (563-564) 275-280, 2007.

OLIVER, S.P.; LEWIS, M.J.; INGLE, T.L. et al. Prevention of bovine mastitis by a premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. **Journal Dairy Science**, v. 76, p.287-292, 1993.

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

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

OLIVEIRA, M. V. V.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, A. A. F. et al., Utilização do Whiteside modificado e Califórnia Mastitis Test no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. **Revista Ciência Animal**, 14(1): 39-45, 2004.

OLIVEIRA, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005. Disponível em www.cbra.org.br

OWENS, W.E.; RAY, C.H.; WATTS, J.L.; YANCEY, R.J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis **Journal Dairy Science**, v.80, p.313-317, 1997.

PARDO, P.E., METTIFOGO, E., MULLER, E.E. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3-4, p.115-118, 1998.

PAULSEN I Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr open Microbiol* 6: 446-451. 2003.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, out./dez., 2003

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; PEREIRA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos produtores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.21, p.171-175, 2001.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis **Journal Dairy Science**. v. 84, p. 1140-1148, 2001

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

PIDDOCK L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology** p. 382-402, Vol. 19, No. 2. 2006.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros, 1992. 150p.

PINHEIRO SÁ M. E. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 320-326, 2004.

PRASAD, R. V.; RATHMAN, K.; SHAH, D. G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira District, India. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 49, p. 441-7, 1996.

PRESCOT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology** p. 819-820, 5 ed. EUA: The Mc Graw-Hill Companies, 2002.

RABELLO, R. F. **Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos**

de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003. 100p.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Presença de *Staphylococcus spp* produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.825-829, 2005.

ROHRER S, MAKI H, BERGER-BÄCHI B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? **Journal of Medical Microbiology** 52 (PT 8):605-7, 2003.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. et al. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology** v.42, p.3449-3455, 2004.

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

SAMARA, S.I.; DUTRA, I.S.; FRANCESCHINI, P.H.; MOLERO FILHO, J.R.; CHACUR, M.G.M. Sanidade e produtividade em búfalos. Jaboticabal: Funep-UNESP, 1993. 203p.

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. (Eds) **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 130, n. 5, p.199-207, 1957.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE**. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-7, 1994.

SILVA, P.E.A.; BIGI, F.; SANTANGELO, M.P.; ROMANO, M.I.; MARTIN, C.; CATALDI, A.; AINSA, J.A. Characterization of P55 a Multidrug Efflux Pump in Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agentes Chemother** 45(3): 800-804, 2001.

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

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

SILVA MST, LOURENÇO JR JB, MIRANDA HÁ, ERCHESSEN R, FONSECA RFSR, MELO JA, COSTA JM. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF. Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em www.cpatu.Silva et al, 2003.br/bufalo Acesso em 03 mar. 2010.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.111-119, 2004.

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

SOUZA, G.N., BRITO, J.R.F., MOREIRA E.C., BRITO, M.A.V.P., BASTOS R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl. 2, p.251-260, 2005.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. et al. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl.2, p.251-260, 2005b.

SPENCER, S.B. Equipamento de ordenha X controle de mastite e qualidade do leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p.119-148.

TEIXEIRA L. V., BASTIANETTO E., OLIVEIRA D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005. Disponível em www.cbra.org.br

THOMAS, C. S. **Milking management of dairy buffaloes**. 2004. 44 f. Doctoral thesis. Department of Animal Nutrition and Management – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004. Disponível em: <<http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000512/01/Thesis.PDF>> Acesso em : 30 out. 2007.

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 56, p. 1323-1326, 1990.

VAN DUIJKEREN, E., BOX, A.T.A., HECK, M.E.O.C., WANNET, W.J.B., FLUIT, A.C., Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, 103, 91-97, 2004a.

VARSHNEY, J. P. & NARESH, R. Evaluation of a homeopathic complex in the clinical management of udder diseases of riverine buffaloes. **Homeopathy**, v. 93, n. 1, p. 17-20, 2004.

VELÁZQUEZ-MEZA ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. **Salud Publica de Mexico**, 47(5) 381-7, 2005.

VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.410-415, 2008.

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

VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A. Eficiência do California Mastitis Test (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, v. 4, p. 3-4, 1990.

VIANNI M. C.E.; LÁZARO N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina **Pesquisa Veterinária Brasileira** vol.23 no.2 Rio de Janeiro 2003.

WEBBER, M. A. e PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 51, 9-11 2003.

WEESE, J.S., DICK, H., WILLEY, B.M., MCGEER, A., KREISWIRTH, B.N., INNIS, B., LOW, D.E., Suspected transmission of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, 115, 148–155, 2006.

ZHANG, H. Z.; HACKBARTH, C.J.; CHANSKY, K. M.; CHAMBERS, H.F.A. Proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to betalactamasin *Staphylococci*. **Science**, v. 291, n. 5510, p. 1962-1965, 2001.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 38, p. 493-498, 2004.

5. ARTIGOS

ARTIGO 1

BUBALINE MASTITIS ETIOLOGY IN NORTHEAST OF BRAZIL

Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil

Elizabeth S. de Medeiros.^I; Manuela F. L. de Freitas,^{II}; José W. Pinheiro Júnior^{III};
Tomoe N. Saukas^I, Carina da C. Krewer^{IV}, André S. Santos^I, Mateus M. da Costa^{IV},
Rinaldo A. Mota^{I*}

^IDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

^{II}Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, *Campus* Vitória,
Vitória, PE, Brasil

^{III}Departamento de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns,
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil

^{IV}Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina,
PE, Brasil

ABSTRACT

This study aimed to assess the frequency of clinical and subclinical mastitis and to describe the microorganisms involved in inflammatory process of the mammary gland in dairy buffalo herds in the Northeast of Brazil. 1,896 milk samples were analyzed from 474 buffaloes from four dairy farms located in the States of Alagoas, Bahia, Ceará, and Pernambuco. After a physical examination of the mammary gland, milk secretion from each tit was submitted to testing using Tamis and CMT (California Mastitis test). Positive samples of CMT (++ and +++) and results of the Tamis test were subjected to a

microbiological examination. Of the total samples studied, 90/1,896 (4.7%) exhibited clinical mastitis. With respect to the CMT, it was noted that 651/1,896 (34.3%) of the samples submitted exhibited subclinical mastitis (scores: +, ++ e +++). *Staphylococcus* spp. were most frequently found, followed by *Corynebacterium* spp. and gram-negative bacteria. The results obtained in this study demonstrate a high incidence of clinical and subclinical mastitis in herds in northeastern Brazil bubaline, particularly the coagulase negative Staphylococci (CNS). It is recommended that better practices of milk collection be implemented, including the improvement of hygiene and the training milkers in order to reduce the frequency of disease in livestock.

Keywords: milk, mammary gland, buffaloes, microorganisms.

INTRODUCTION

According to FAO, bubaline are the most docile animals in the planet, being useful to meat and milk producing as well as work in several areas of the world (28). The Brazilian herd is composed by three Indian breeds (Murrah, Jafarabadi and Carabao) and one European breed (Mediterranean) introduced in Brazil by Marajó island in Pará state in 1895 (2).

The bubaline herds present the same sanitary problems as bovine ones and among the infectious diseases, mastitis has a strong association with economic losses due drop in milk production and costs with therapy and prevention (5). The inflammatory process of mammary gland can reduce nutritive value of milk and compromise derivatives production (22, 31). The mastitis prevalence in bubalines was

determined in different countries, being 20.6%, 31.9% and 54% in Pakistan, Iraq and Egypt respectively (33).

In Brazil, Langoni et al. (17) report that the most common microorganisms in subclinical bubaline mastitis etiology are: *Corynebacterium bovis* (31.3%), *Staphylococcus epidermidis* (30.1%), *Streptococcus agalactiae* (26.5%), *Staphylococcus aureus* (4.8%), *Acinetobacter calcoaceticus* (2.4%), *Pasteurella multocida* (2.4%) e *Bacillus* spp. (2.4%). Cunha et al. (9) describe *Staphylococcus* spp. as the most prevalent bacteria in clinical and subclinical mastitis cases in bubalines from Rio Grande do Norte state. Kapronezai et al. (14) in São Paulo State found *Staphylococcus* spp. (11.8%), *Corynebacterium* spp. (7.25%), *Streptococcus* spp. (3.0%) and mixed infections (1.95%). Considering the few studies about bubaline mastitis etiology, the present study has the purpose to evaluate clinical and subclinical mastitis frequency, as well as the etiology of bubaline mammary glands infections in herds from northeast of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

One thousand ninety six (1,896) milk samples from 474 bubaline females were analyzed. The animals were raised in four farms from Pernambuco, Alagoas, Bahia and Ceará states. The animals had different ages and were Murrah pure or crossbred. The bubaline were under intensive or semi-intensive management and submitted to mechanical milking.

After the physical examination of the mammary gland, lacteous secretion was submitted to Tamis test (3) and CMT (California Mastitis Test) (27). The positive samples to CMT (++ e +++) and Tamis test were collected to microbiological examination after teat disinfection using ethanol 70°GL. The samples were transported in isothermal boxes to laboratory. Ten micro liters (10µl) milk aliquots were streaked onto 5% ovine blood agar and Sabouraud agar and incubated at 37°C for 24h, 48h and 72h. The morphological characteristics of the colonies (size, color and haemolysis) were observed, as well as the morphological and Gram stain characteristics of the bacterial cells (4).

Phenotypic identification of Gram positive bacteria was performed according to Quinn et al. (25). The biochemical tests employed to *Staphylococcus* spp. classification were free coagulase production, DNase and catalase, according to Silva et al. (29). Acetoin production, glucose (anaerobiosis) and mannitol (aerobiosis and anaerobiosis) fermentation proves were performed according to Mac Faddin (18). The isolates belonging to Enterobacteriaceae family were classified using the following biochemical tests: urease production, triple sugar iron agar reactions, methyl red / Voges-Proskauer, SIM agar reactions and citrate utilization (4). *Candida* spp. yeasts were identified according to Kreger Van Rij (16).

The absolute and relative frequency statistical analysis was performed according to Sampaio (26) descriptions.

RESULTS

In the CMT test, 802 from 1,896 milk samples (42.2%) were classified as mastitic (sub clinically). The score positivity percentage were 18.0% to ++ score, 16.3% to +++ score and 8.0% to + score. The isolated microorganisms from clinical and subclinical bubaline mastitis are presented in table 1. From 1,896 analyzed samples, 90/1,896 (4.7%) demonstrated clinical mastitis by Tamis test and from these 19/1,896 (1.0%) had chronic mastitis with tissue atrophy, whose milk collection for microbiological culture were not possible. Fifty one milk samples (71.8%-51/71) were positive in bacteriological analyses. The most prevalent bacteria were *Staphylococcus* spp (42.2%), followed by *Corynebacterium* spp (11.3%) and Gram-negative bacteria (5.6%).

When the Brazilian states were analyzed, in Pernambuco, from 27 CMT positive samples 24 were positive for bacteriologic culture. The etiologic agent most frequent was *Staphylococcus* spp., being one coagulase positive Staphylococci (CPS) and 12 CNS. In Alagoas state, from 392 samples 77 were positive for microbiologic culture. The most identified genus was *Staphylococcus* spp., being two CPS and 54 CNS. In Bahia, from 960 milk samples collected, clinical mastitis was found in 62 and 31 samples were positive for bacteriologic culture. From 300 positive samples in CMT test 123 presented bacterial growth. Once again *Staphylococcus* spp. were the microorganism more frequent, being three *S. aureus*, 34 CPS and 70 CNS. In Ceará, from 288 analyzed samples, four presented clinical mastitis, being isolated bacterial from one of them. In positive samples to CMT (n= 228) test, 101 were positive in the culture. Gram-negative bacteria were more prevalent in bubaline mastitis etiology in Ceará state, being

Escherichia coli (n= 25), and *Klebsiella* spp. (n= 8). All 28 *Staphylococcus* spp. isolates were classified as CNS.

DISCUSSION

The early diagnosis of mastitis is very important to reduce economic losses and increase success in treatment of diseased animals (1). CMT is a very useful test to detection of subclinical mastitis in cattle. The use of CMT test in mastitis diagnosis is controversial (9, 21, 24). Considering the high prevalence of carriers in buffaloes, CMT test may be not useful to a precise mastitis diagnosis (9, 24). Muhammad et al. (21) found a strong association between CMT and Surf field mastitis test (SFMT) positive results and mastitis in buffaloes from Pakistan. Besides relationship among Somatic cells count, mastitis and intramammary infections are reported (11, 19).

Studies about bubaline mastitis are rare and few animals were evaluated in these surveys (1, 9, 12). In northeast of Brazil, studies were generally designed in a punctual manner, what stress the importance of the more thorough researches like here. In Pernambuco state, Oliveira et al. (24) observed 13% de CPS and 42% CNS. In São Paulo state Costa et al. (8) evaluated 778 bubaline female and found a clinical mastitis prevalence of 0.44% and subclinical mastitis of 7.15%. These results are in according to observed in this study since subclinical cases were more frequent that clinical ones.

In Ceará state, coliform bacteria were associated to clinical and subclinical mastitis. The same findings were described by Oliveira (23) who isolated enterobacteria in 8.8% of bubaline milk samples in São Paulo state. According to El-Khodery and Osman (13) mastitis by coliform may present several clinical signs of udder infection

with some systemic reactions. These differences in mastitis pathogenesis may be associated to genetic diversity of bacterial isolates (32).

Some factors are associated to higher incidences of Gram-negative bacteria in Ceará as bubaline farms like reflux of disinfectant in pre and post dipping and use of not treated water to clean teat and facilities. Buffaloes were carried under semi intensive systems that permit to spread of Gram-negative pathogens from the environment. Muhammad et al. (20) suggest that aquatic behavior of bubaline can increase environmental mastitis infections rates, as well as the bedding material (13).

In farms from Pernambuco, Alagoas e Bahia states, the most frequent isolated bacteria type were *Staphylococcus* spp. From 203 *Staphylococcus* spp. isolates, 1.5% (3/203) were identified as *S. aureus*, 18.2% (37/203) as CPS and 80.3% (163/203) as CNS. Other brazilian studies reported that *Staphylococcus* spp. are the most frequent etiologic agent of buffaloes mastitis. These bacteria are transmitted only during the milking and are very important to understand epidemiology of bubaline mastitis (15, 20).

The relevance of CNS in intrammary infection increased in recent years. These agents were considered with low importance in infectious process of mammary glands. However, Costa et al. (7) stress the increase in bubaline mastitis caused by CNS. This high prevalence is found in this study. According to Taponen and Pyörälä (30), CNS becomes the most prevalent etiologic agent of udder infection in cattle in some countries. Although with middle clinical signs these pathogens are more persistent in the udder, as well as associated to high economic losses by fall in milk quality and quantity.

The source of CNS are unclear and the bacteria may be found in teat canals, skin and other extramammary sites (30). Several studies have concluded that the major transmission route of *Staphylococcus* spp. is the milker hands by poorly milking hygiene and fails in equipments sanitization. Health education measures about the critical control points must be adopted with the goal of reducing the *Staphylococcus* spp. prevalence in the herds. In all bubaline milking farms where *Staphylococcus* spp. were the most prevalent pathogen, critical points were identified as problems in pre and post dipping; fail in milk equipments maintenance, no trained milker; poorly hygiene in milking room; fails in equipments sanitization and absence of milking line.

Other important milk pathogens were isolated from bubaline females. *Corynebacterium* spp. and *Streptococcus* spp. were less prevalent than those described by Langoni et al. (17) and Ahmed et al. (1), but higher than observed by Dhakal et al. (12). *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. are the most prevalent agents in bubaline mastitis in Brazil (17). *Candida* spp. was isolated in 0.8% of milk samples. The same results were reported by Chhabra et al. (6). Mastitis micotic by *Aspergillus fumigatus* was reported in Brazil and was associated to previous antibacterial treatment (24).

According to Cunha Neto (10), the bubaline milking may be guided by the same criteria for bovine one. In buffaloes, actions related to improving the quality of raw milk must be assumed. Among these strategies are improved hygiene and sanitization of milking room and equipments, good manipulation practices, sanitary management of the herds, mastitis control and good water supply.

The results of this study show a higher clinical and subclinical mastitis frequency in Brazilian Northeast bubaline herds. The most prevalent bacteria were coagulase negative *Staphylococcus* spp. The good practices to obtain milk, facilities sanitization and milker education can decrease mastitis prevalence in bubaline herds.

Etiologia da mastite bubalina no Nordeste do Brasil

Resumo: Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de mastite clínica e subclínica e descrever os microrganismos envolvidos no processo inflamatório da glândula mamária nos rebanhos de búfalo leiteiro no nordeste do Brasil. Foram analisadas 1.896 amostras de leite provenientes de 474 búfalos em quatro propriedades leiteiras localizadas nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco. Após o exame físico da glândula mamária, as amostras de leite foram submetidas aos testes da caneca do fundo preto e CMT (California Mastitis Test). As amostras positivas para o CMT (+ + e + + +) e para a caneca do fundo preto foram submetidas ao exame bacteriológico. Do total de amostras estudadas, 90/1.896 (4,7%) apresentaram mastite clínica. Com relação ao CMT, observou-se que 651/1.896 (34,3%) das amostras demonstraram mastite subclínica (pontuações +, + + e + + +). *Staphylococcus* spp. foram os microrganismos mais frequentes, seguidos de *Corynebacterium* spp. e Gram-negativas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram uma elevada incidência de mastite clínica e subclínica em rebanhos bubalinos no nordeste do Brasil, especialmente causadas por *Staphylococcus* coagulase negativa (CNS). Recomenda-se que o processo de coleta de leite seja aprimorado, incluindo melhorias na higiene e treinamento de ordenhadores a fim de reduzir a frequência da doença no gado.

Palavras-chave: leite, glândula mamária, búfalos, microrganismos.

REFERENCES

1. Ahmed, W.M.; Sherein, I.; Abd El-Moez; Nabil, G.M. (2008). Observations on sub-clinical mastitis in buffalo-cows with emphasis on measuring of milk electrical resistance for its early detection. *Global Veterinaria*, 2 (1), 41-45.
2. Amorim Júnior, A.A.; Miglino, M.A.; Amorim, M.J.A.A.L.; Santos, T.C. (2002). Sistematização da veia cava cranial em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 39 (6), 306-310.
3. Blood, D.C.; Radostosis, O.M. (1991). *Veterinary Medicine*. Baillière Tindall, London.
4. Carter, G.R. (1984). *Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária*. Roca, São Paulo, SP.
5. Carvalho, L.B.; Amaral, F.R.; Brito, M.A.V.P.; Lange, C.C.; Brito, J.R.F.; Leite, R.C. (2007). Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59 (1), 242-245.
6. Chhabra, D.; Moghe, M.N.; Tanwani, S.K.; Sharada, R. (1998). Mycotic mastitis in buffaloes. *Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. and Infec. Dis.*, 19 (2), 108-110.
7. Costa, E.O.; Garino Jr, F.; Watanabe, E.T.; Ribeiro, A.R.; Vezon, P.; Baruselli, P.S.; Paske, A. (1997). Study of mastitis among ten dairy buffalos herds (*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. Proceedings 5th World Buffalo Congress, Caserta, Italy p.635-638.

8. Costa, E.O.; Wantanabe, E.T.; Ribeiro, A.R.; Garino, J.R.; Horiuti, A.M.; Baruselli, P.S. (2000). Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica. *Napgama*, 3 (1), 312-315.
9. 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. (2006). Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq. Inst. Biol.*, 73 (1), 17-21.
10. Cunha Neto, O.C. (2003). Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. 71p.
11. Dhakal, I.P. (2006). Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. *J. Vet. Med. B.*, 53 (2), 81-86.
12. Dhakal, I.P.; Dhakal, P.; Koshihara, T.; Nagahata, H. (2007). Epidemiological and bacteriological survey of buffalo mastitis in Nepal. *J. Vet. Med. Sci.*, 69 (12), 1241-1245.
13. El-Khodery, S.A.; Osman, A. (2008). Acute coliform mastitis in buffaloes (*Bubalus bubalis*): clinical findings and treatment outcomes. *Trop. Anim. Health Prod.*, 40 (2), 93-99.
14. Kapronezai, J.; Melville, P.; Benites, N.R. (2005). Análise microbiológica, teste de tamis e california mastitis test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 72 (2), 183-187.

15. Kapur, V.; Sisco, W.M.; Greer, R.S.; Whittam, T.S.; Musser, J.M. (1995). Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (2), 376-380.
16. Kreger Van Rij, N.J.W. (1984). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, New York.
17. Langoni, H.; Domingues, P.F.; Molero Filho, J.R.; Baldini, S. (2001). Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). *ARS Vet.*, 17, 213-217.
18. Mac Faddin, J.F. (1980). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore, London.
19. Moroni, P.; Rossi, C.S.; Pisoni, G.; Bronzo, V.; Castiglioni, B.; Boettcher, P.J. (2006). Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *J. Dairy Sci.*, 89, 998-1003.
20. Muhammad, G.; Lodhi, L.A.; Athar, M.; Rehman, F. (1997). Evaluation of cephalexin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. *Ind. J. Dairy Sci.*, 50, 205-208.
21. Muhammad, G.; Naureen, A.; Muhammad, N.A.; Muhammad, S.; Fazal-ur-Rehman. (2010). Evaluation of a 3% surf solution (surf field mastitis test) for the diagnosis of subclinical bovine and bubaline mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.*, 42 (3), 457-464.
22. Nader Filho, A.; Amaral, L.A.; Tonhati, H.; Penha, L.H.C.; Toledo, L.M. (1996). Variação das características físico-químicas do leite de búfala, durante os diferentes meses do período de lactação. *ARS Vet.*, 12, 148-153.

23. Oliveira, A.A.F. (2003). Avaliação citológica aspirativa e de expressão no diagnóstico da mastite bubalina e pesquisa de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* toxigênicas e produtoras de beta-lactamase. Tese de Doutorado em Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 123p.
24. Oliveira, M.V.V.; Mota, R.A.; Oliveira, A.A.F.; Meirelles, F.S.; Silva, F.F. (2004). Utilização do whiteside modificado e califórnia mastitis test no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. *Rev. Ciênc. Anim.*, 14, 39-45.
25. Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.; Carter, G. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, London.
26. Sampaio, I.B.M. (1998). *Estatística aplicada à experimentação animal*. UFMG, Belo Horizonte:UFMG. 221p.
27. Schalm, O.W.; Noorlander, D.O. (1957). Experimental and observations leading to development of the califórnia mastitis test. *J Am Vet Med Assoc.*, 130, 199-207.
28. Silva, M.S.T.; Lourenço Jr, J.B.; Miranda, H.A.; Erchesen, R.; Fonseca, R.F.S.R.; Melo J.A.; Costa, J.M. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF. Disponível em: www.cpatu.br/bufalo. Acesso em 05/09/2009.
29. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A. (1997). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela, São Paulo.

30. Taponen, S.; Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microb.*, 134 (2), 29-36.
31. Teixeira, L.V.; Bastianetto, E.; Oliveira, D.A.A. (2005). Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29 (2), 96-100.
32. Wenz, J.R.; Barrington, G.M.; Garry, F.B.; Ellis, R.P.; Magnuson, R.J. (2006). *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J. Dairy Sci.*, 89, 3408-3412.
33. Vianni, M.C.; Lázaro, N.S. (2003). Perfil de susceptibilidades a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isolados de mastite subclínica bubalina. *Pesq. Vet. Bras.*, 23, 47-51.

**Table 1. Isolated microorganisms from clinical and subclinical mastitis cases in
bubaline herds in Northeast of Brazil.**

Microrganisms	F.A	F.R.
<i>Staphylococcus</i> spp	185	49,4
<i>Streptococcus</i> spp	14	3,7
<i>Corynebacterium</i> spp	87	23,2
<i>Micrococcus</i> spp	07	1,8
<i>Bacillus</i> spp	02	0,5
<i>Candida</i> spp	03	0,8
Gram negative	62	16,5
Mixed infections		
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Corynebacterium</i> spp	08	2,1
<i>Corynebacterium</i> spp + Gram negative	02	0,5
<i>Staphylococcus</i> spp + Gram negative	08	2,1
<i>Corynebacterium</i> spp + <i>Micrococcus</i> spp	01	0,2
Gram negative + <i>Bacillus</i> spp	01	0,2
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Bacillus</i> spp	01	0,2
<i>Staphylococcus</i> spp + <i>Candida</i> spp	01	0,2
Total ⁽¹⁾	374	

(1) - Considering that a same animal can carry more than one bacteria only the number used to percentual determination are adopted,

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY GUIDELINES TO AUTHORS SCOPE OF THE JOURNAL

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The

Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too

Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that...

Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like “Effects of”, “Influence of”, “Study on”, etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the *Resumo* for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited. The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.*(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: [http:// www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html). Accessed 26 May 2006.

References citing “personal communication” or “unpublished data” are discouraged, although it is recognized that

sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are “accepted for publication” or “in press” are acceptable. However, references of papers that are “submitted” or “in preparation” are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi)

ARTIGO 2

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *STAPHYLOCOCCUS* SPP. FROM
BUFFALOES MASTITIS IN BRAZIL**

Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from buffaloes mastitis in Brazil

E. S. de Medeiros^a, C. A. França^b, C. da C. Krewer^b, R. de M. Peixoto^b, A. F. de Souza Júnior^b, M. B. de Cavalcante^b, M. M. da Costa^b, R. A. Mota^{a*}

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

^b Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brasil

*Corresponding author. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 51171-900, Brazil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

Abstract

Persistent buffalo mastitis due *Staphylococcus* spp. brings many economic losses and may be resistant to antimicrobial therapy. The aim of present study was to determine resistance patterns and the presence of *mecA*, *blaZ* and efflux pump in *Staphylococcus* spp. isolated from buffaloes mastitis in Brazilian herds. Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion test and the presence of *mecA* and *blaZ* genes by PCR. Efflux pump screening test was performed by growing in Muller Hinton agar containing ethidium bromide. The percentual of resistance to tested drugs were: 71.8% to penicillin, 49.2% to amoxicillin, 65.8% to oxacillin, 62.3% to cefquinome, 44.7% to cephalonium, 45.2% to ciprofloxacin, 32.6% to enrofloxacin, 58.7% to erythromycin, 42.7% to florfenicol, 34.6% to gentamicin, 35.1% to trimethoprim:sulfamethoxazole, 8.5% to tetracycline + neomycin + bacitracin, 43.2% to cephalothin, 38.1% to streptomycin, 58.7% to tetracycline, 31.6% to norfloxacin, 45.2% to ceftriaxone, 43.2% to nitrofurantoin, 57.7% to doxycycline and 53.7% to cephalexin. Simultaneous resistance to four antimicrobial drugs groups or more were observed in 112 isolates, as well as *mecA* (11), *blaZ* (79) genes and efflux pump (47). *Staphylococcus* spp. isolates from

mastitis in buffaloes from Brazil show different level of resistance and caution may be adopted concerning therapy choice aiming to minimize public health risk.

Keywords: Bubalines, milk, multi drug resistance, *mecA*, *blaZ*, efflux pump.

1. Introduction

Mastitis is one of the most important problems for ruminant dairy herds around the world (Getahum et al., 2008). The economic losses are associated to drop in quantity and quality of milk production, as well as to increased costs with treatment and control programs (Dhakal et al., 2002; Dhakal et al., 2007). Mastitis is defined as a multifactorial disease associated to inflammatory processes in the mammary gland (McDougall et al., 2009).

The Brazilian herds are composed by three Indian breeds (Murrah, Jafarabadi and Carabao) and one European breed (Mediterranean) introduced in Brazil by Marajó island in Pará state in 1895 (Amorim Junior et al., 2002). In Brazil, many studies report mastitis prevalence around 40% of buffaloes in a farm (Langoni et al., 2001; Cunha et al., 2006). The major etiologic agents in subclinical mastitis are Coagulase-Negative *Staphylococci* (CNS), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. (Oliveira et al., 2004; Cunha et al., 2006).

S. aureus has been recognized as the most important bacterial pathogen in ruminant mastitis (Aires-de-Souza et al., 2007). CNS are considered emerging agents of subclinical or mild clinical mastitis (Taponen and Pyörälä, 2009). In a Review of CNS mastitis epidemiology, Taponen and Pyörälä (2009) stress that the origin of CNS are unclear and may be in the teat canal, skin and other extramammary sites. CNS tends to be more resistant to antimicrobial drugs than *S. aureus* and associated to persistent infections (Taponen and Pyörälä, 2009). The resistance of *S. aureus* is well determined

and may be enhanced by mutation, evolution and transference of mobile genetic elements (Lowy, 2003; Perez et al., 2008; Jayaraman, 2009). Multi Drug Resistance (MDR) may be found in *S. aureus* and CNS isolates from mastitis (Taponen and Pyörälä, 2009; Kumar et al., 2009).

Two genetic mechanisms are associated to B-lactams antibiotic class resistance in *Staphylococcus* spp. (Olsen et al., 2006). The most important is the B-lactamase production that may be mediated by the *blaZ* gene (Olsen et al., 2006; Taponen and Pyörälä, 2009). Methicillin (and B-lactams) resistance is also associated to *mecA* gene which codes for PBP2a, a cell wall synthetic protein with low affinity in binding to B-lactams (Lowy, 2003; Katayama et al., 2005). Leonard and Markey (2008) suggest that *mec* cassette was acquired by *S. aureus* from CNS.

The decrease in intracellular concentration of antimicrobial drugs is a very important strategy to antimicrobial resistance (Hassan et al., 2007). Efflux mediated antimicrobial resistance are based on a cell process energy-dependent and associated to resistance against several drugs as macrolides and disinfectants (Butaye et al., 2003; Bjorland et al., 2005). These mechanisms are described in gram positive and gram negative bacteria, including *Staphylococcus* spp. isolates from mammary gland infections (Hassan et al., 2007; Bjorland et al., 2005).

The present study aims to determine the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis in buffaloes from northeastern (Bahia, Alagoas, Pernambuco and Ceara States) Brazilian herds, as well as to know the prevalence of antimicrobial resistance determinants as *mecA* and *blaZ* genes and efflux pump.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial

One hundred ninety nine (199) *Staphylococcus* spp. isolates from buffaloes mastitis were analyzed. Animals were from Pernambuco (n=7), Alagoas (n=57), Bahia (n=105) and Ceará (n=30) states. The animals had different ages and were pure Murrah or crossbred and were raised under intensive or semi-intensive management and submitted to mechanical milking. The biochemical tests employed to *Staphylococcus* spp. classification were free coagulase production, DNase and catalase, according to Quinn et al. (1994).

2.2. Antimicrobial susceptibility test

The resistance pattern of *Staphylococcus* spp. isolates was determined by disk diffusion test (CLSI, 2006). The tested drugs were: penicillin (10IU), amoxicillin (30µg), oxacillin (5 µg), cefquinome (8 µg), cephalonium (30 µg), ciprofloxacin (30 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (10 µg), florfenicol (30 µg), gentamicin (30 µg), trimethoprim:sulfamethoxazole (25 µg), tetracycline + neomycin + bacitracin (µg g), cephalothin (30 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), norfloxacin (10 µg), ceftriaxone (30 µg), nitrofurantoin (30 µg), doxycycline (30 µg) and cephalixin (30 µg). The MDR rate was calculated by dividing the number of resistant antimicrobial groups by total of tested antimicrobial groups (Krumperman, 1983).

2.3. PCR for *mecA* and *blaZ* genes

For the *mecA* and *blaZ* genes detection, primers and cycle conditions described by Murakami et al. (1991) and Sawant et al. (2009) were used. Bacterial genomic DNA was obtained by thermal extraction (Greco et al., 2008). Two micro liters of template

DNA was added to 23 ml of master mix containing 4pmol of primer, 0,4 mM of dNTPs mix, 1U of *Taq* DNA polimerase (Ludwig- Biotec), buffer (10mM Tris-HCl [ph 8,5] and 50mM KCl), 2 mM of MgCl₂. As positive control, DNA from Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was used. The amplicons with 214 bp (*mecA*) and 517 bp (*blaZ*) were verified in 1.5% of agarose gel stained with ethidium bromide (0.5µg/mL) and observed under UV illumination.

2.4. Efflux pump detection

In order to screen the efflux pump in *Staphylococcus* spp. an ethidium bromide procedure was selected (Bjorland et al., 2007). Isolates were grown in Mueller Hinton Agar (MH) containing ethidium bromide (0.5 mg/ml). The efflux mediated resistance was considered present when colonies did not show any fluorescence under UV examination.

3. Results

The amount of *Staphylococcus* spp. resistant isolates in disk diffusion test may be observed in figure 1. The resistance percentage to tested drugs were: 71.8% to penicillin, 49.2% to amoxicillin, 65.8% to oxacillin, 62.3% to cefquinome, 44.7% to cephalonium, 45.2% to ciprofloxacin, 32.6% to enrofloxacin, 58.7% to erythromycin, 42.7% to florfenicol, 34.6% to gentamicin, 35.1% to trimethoprim:sulfamethoxazole, 8.5% to tetracycline + neomycin + bacitracin, 43.2% to cephalothin, 38.1% to streptomycin, 58.7% to tetracycline, 31.6% to norfloxacin, 45.2% to ceftriaxone, 43.2% to nitrofurantoin, 57.7% to doxycycline and 53.7% to cephalexin. Concerning MDR rate, it varies among 0 to 1 (figure 2). Eighteen (9%) *Staphylococcus* spp. isolates were sensitive to all antimicrobial drugs tested. Multi resistant isolates (n=112) to four or

more antimicrobial drugs groups simultaneously were observed in this study (table 1). Forty seven (23.6%) *Staphylococcus* spp. isolates were resistant to all tested drugs.

PCR amplifications for *mecA* and *blaZ* genes were positive in 11 (5.5%) and 79 (39.6%) of *Staphylococcus* spp. Isolates, respectively. Both genes were simultaneously amplified in 9 (4.52%) isolates (Table1). One hundred eighteen isolates were negative to both *mecA* and *blaZ* gene.

In the screening test for efflux pump, 47 isolates (23.61%) were considered positive. This number is lower than the number of erythromycin (macrolide) resistant isolates (n = 117). The association among *mecA*, *blaZ* and efflux pump were observed in five *Staphylococcus* spp.

4. Discussion

Buffaloes mastitis brings very high economic losses and the need for antimicrobial therapy (Langoni et al., 2001; Cunha et al., 2006; Dhakal et al., 2007). The selection of resistant bacteria after antimicrobial therapy is a preoccupying problem in veterinary medicine (Kumar et al., 2009). The multi resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from ruminant mastitis is increasing, especially among CNS (Pitkälä et al., 2004; Taponen and Pyörälä, 2009).

Studies performed with *Staphylococcus* spp. found a high percentage of isolates showing sensitivity to all tested drugs (Aires-de-Souza et al., 2007; Pitkälä et al., 2004). In the present study, this was observed only in eighteen isolates, which is in accordance to the descriptions of Kumar et al. (2009), evaluating *S. aureus* from cattle mastitis. The MDR rates observed here were higher than those described by Pitkälä et al. (2004) and Sawant et al. (2009).

The resistance of *Staphylococcus* spp. to B-lactams is well determined and associated to penicillin ring inactivation and production of PBP2a (Lowy, 2003). The percentage of resistance to B-lactams was variable, with the higher to penicillin (71.8%) and lower to cephalonium (44.7%). These results are higher than those described by Aires-de-Souza et al. (2007), which evaluated the resistance of *Staphylococcus* spp. from different ruminant species, being 33 from buffaloes. In CNS from bovine milk, lower resistance to B-lactams was detected (Sawant et al., 2009). However, Kumar et al. (2009) and Rabello et al. (2005) reported similar results to these presented here.

According to Taponen and Pyörälä (2009), CNS are more resistant than *S. aureus* and may be a source of resistance genes to B-lactams. High resistance level to specific antibiotic may be associated to frequent and long use (Pitkälä et al., 2004; Kumar et al., 2009). There is low antimicrobial drug usage in the buffaloes analyzed here, but the animals were raised closed to cattle, where the use of antimicrobial drugs is significantly high.

Resistance to oxacillin, a marker for methicillin resistance, was found in 65.8% of the *Staphylococcus* isolates more than observed by *mecA* amplification by PCR (5.52%). Ten *mecA* positive isolates were resistant to oxacillin. One *mecA* positive isolated in PCR was oxacillin sensitive. Same results were reported by Kumar et al. (2009), suggesting that variations in resistance expression may be associated to growth conditions. According to Guérin Faulblée et al. (2003), methicillin resistant *Staphylococcus* spp. are unusual in veterinary medicine. In Brazilian buffaloes, *Staphylococcus* spp. isolates *mecA* (5.5%) and *blaZ* (39.6%) genes were detected by PCR, in accordance to Olsen et al. (2006), which suggest that *blaZ* is the most important mechanism to B-lactam resistance. In cattle CNS, the presence of *mecA* (7.14%) and *blaZ* (18.45%) genes were reported by Sawant et al. (2009). Soares et al. (2008),

studying *mecA* gene in animal and animal CNS isolates, describe a frequency of 5.6% only in animal samples. Aires-de-Souza et al. (2007) did not find MRSA in buffaloes isolates. Vesterholm-Nielsen et al. (1999) found 100% of occurrence of *blaZ* gene in penicillin resistant *S. aureus* in Denmark. CNS may be the origin of *mecA* gene in *S. aureus*, but the same did not occur to *blaZ* gene (Olsen et al., 2006; Leonard and Markey, 2008). However, the transference of *mecA* and *blaZ* pool of genes may occur among human and animal *Staphylococcus* spp. isolates (Vesterholm-Nielsen et al., 1999; Katayama et al., 2005; Olsen et al., 2006).

Staphylococcus spp. may harbor *blaZ* and *mecA* gene simultaneously (Sawant et al., 2009). Similar results were observed in the buffaloes isolates analyzed here. The *blaZ* and *mecA* are penicillin binding proteins with a common ancestor (Hiramatsu, 1995). The genes are co-repressed to prevent a toxic overexpression of one of these proteins (Rosato et al., 2003).

In accordance to present study, mastitis *Staphylococcus* spp. isolates presenting higher resistance percentual were described by Sawant et al. (2009) in CNS from dairy cattle. The same result was reported by Kumar et al. (2009) studying *S. aureus* sensitivity in cross breed cattle. However, Pitkälä et al. (2004) reported low resistance to tetracycline and macrolides due to a decrease in antimicrobial drug usage in Finland.

Out of 117 erythromycin resistant isolates, 47 presented efflux pump in MH agar containing ethidium bromide. The resistance to macrolides and tetracycline may occur due to several mechanisms other than efflux pump, such as modification enzymes and ribosome protection (Gatermann et al., 2007; Butaye et al., 2003; Hassan et al., 2007). No identified resistance mechanisms are usual in CNS isolates with macrolide resistance (Fiebelkorn et al., 2003). There are differences in the occurrence of resistance

mechanisms for erythromycin related to geographic localization of *Staphylococcus* spp. isolates (Gatermann et al., 2007).

Five isolates presented three mechanisms to antimicrobial resistance simultaneously. The same results were reported by Sawant et al. (2009). This indicated the spread of mechanisms associated to antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. in Brazilian buffaloes. Aires-de-Souza et al. (2007) reported genetic relationship of Brazilian buffalo *S. aureus* isolates to human and ruminants.

Laboratory antimicrobial susceptibility tests may be an excellent indicator of therapy success in herds infected by CNS (Sawant et al., 2009). Here, quinolones and gentamicin presented lower resistance results. The same results are described by Kumar et al. (2009). Gentamicin and enrofloxacin are considered the most effective drug to use in buffalo and cattle *S. aureus* mastitis treatment (Ibqal et al., 2004; Hussain et al., 2007). Association of antimicrobial drugs may be useful to antimicrobial therapy in mastitis (Oliveira et al., 2000). Here, the lowest resistance was obtained with a three drug combination (tetracycline + neomycin + bacitracin), suggesting potential for mastitis treatment.

5. Conclusions

Buffaloes *Staphylococcus* spp. isolates show differences in resistance patterns with penicillin the highest and the tetracycline + neomycin + bacitracin association the lowest. MDR was observed among *Staphylococcus* spp. isolates. Genes associated to B-lactams resistance (*mecA* and *blaZ*) were amplified by PCR. Efflux pump were detected in resistant isolates.

References

Aires-de-Souza, M., Parente, C.E.S.R., Vieira-da-Mota, O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A., Lencatre, H. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine and caprine Milk samples collected in Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. and Envir Microbiol.** 73, 3845-3849.

Amorim Júnior A.A., Miglino M.A., Amorim M.J.A.A.L., Santos T.C. 2002. Sistematização da veia cava cranial em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 39, 306-310.

Bjorland, J, Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M., Heir, E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. **Journ. of Clin. Microbiol.** 43, 4363-4368.

Butaye, P., Cloeckaert, A., Schwarz, S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int. Jour. of Antim. Agen..** 22, 205-210.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, CLSI.

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. 2006. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol.** 73, 17-21.

De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M. 2000 Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Europe and United States. **J. Dairy Sc.** 83, 855-862.

Dhawal, I.P., Dhawal, P., Koshihara, T., Nagahata, H. 2007. Epidemiological and bacteriological survey of buffalo mastitis in Nepal. **J. Vet. Med. Sci.** 69, 1241-1245.

Dhakal, I.P., Thapa, B.B. 2002. Economic impact of clinical mastitis in the buffaloes in Nepal. **Buffalo J.** 2, 225-243.

Fiebelkorn, K.R., Crawford, S.A., McElmeel, M.L. *et al.* 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.** 41, 4740-4744.

Gatermann, S.G., Koschinski, T., Friedrich, S. 2007. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Infect.** 13, 777-781.

Getahun, K., Kelay, B., Bekana, M., Lobago, F. 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. **Trop. An. Heal. Produc.** 40, 261-168.

Greco, C., Mastronardi, C., Pagotto, F., Mack, D., Ramirez-Arcos, S. 2008. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusionsdoi:** 10.1111/j.1537-2995.2007.01631.x.

Guérin-Faubleé, V., Carret, G., Houffschmitt, P. 2003. *In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. **Vet. Rec.** 152, 466-471.

Hassan, K.A., Skurray, R.A., Brown, M.H. 2007. Active export proteins mediating drug resistance in Staphylococci. **Jour of Mol Microbiol and Biot.** 12, 180-196.

Hiramatsu, K. 1995. Molecular evolution of MRSA. **Microbiology.** 39, 531-543.

Hussain, A., Shakoor, A., Shahid, M.A., Numam, M., Gulraiz, F. 2007. Clinical and subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy buffaloes: Disease characteristics and antibiotic susceptibility profiles of isolates. **Int. Jour. of Agric. Res.** 2, 804-811.

Iqbal, M., Khan, M.A., Daraz, B., Saddique, U. 2004. Bacteriology of mastitic Milk and *in vitro* antibiogram of the isolates. **Pak. Vet. J.** 24, 161-164.

Jayaraman, R. 2009. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. **Curr. Sci.** 96, 1475-1484.

Katayama, Y., Robinson, D.A., Enright, M.C., Chambers, H. 2005. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. **Journ. of Clin. Microbiol.** 43, 2380-2383.

Kumar, R., Yadav, B.R., Singh, R.S. 2009. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Curr. Microbiol.** DOI 10.1007/s00284-009-9553-1.

Krumperman, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 46, 165-170.

Langoni, H., Domingues, P.F., Molero Filho, J.R., Baldini, S. 2001. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalas. **Ars Veterinária.** 17, 213-217.

Leonard, F.C., Markey, B.K. 2008. Meticilin-resistance *Staphylococcus aureus* in animals – a review. **Vet. J.** 175, 27-36.

Lowy, F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.** 111, 1265-1273.

Murakami, K.W., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin resistant strains of taphylococci by polymerase chain reaction. **Jour. of Clin. Microbiol.** 29, 2240-2244.

McDougall, S., Parker, K.I. 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Vet. Microbiol.** 134,177-185.

Oliveira, M.V.V., Mota, R.A.; Oliveira, A.A.F., Meirelles, F.S., Silva, F.F. 2004. Utilização do whiteside modificado e *California Mastitis Test* no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. **Ciê. Anim.** 14, 39-45.

Olsen, J.E., Christensen, H., Aarestrup, F.M. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journ. of Antimic. Chem.** 57, 450-460.

Perez, F., Salata, R.A., Bonomo, R.A. 2008. Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria. **Infec and Drug Res.** 1, 27-44.

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyölä, S., Myllys, V.; Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **J. Dairy Sci.** 87, 2433-2441.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. 1994. **Clin. Veter. Microbial.** London: wolf, 648p.

Rabello, R.F., Souza, C.R., Duarte, R.S. *et al.* 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Dairy Sci.** 88, 3211-3219.

Rosato, A.E., Kreiswirth, B.N., Craig, W.A., Eisner, W., Climo, M.W., Archer, G.L. 2003. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimic. Agen. and Chem.** 47, 1460-1463.

Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Oliver, S.P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Vet. Microbiol.** 134, 73-81.

Soares, L.C., Pereira, I.A., Coelho, S.M.O., Cunha, C.M.M., Oliveira, D.F.B., Miranda, A.N., Souza, M.M.S. 2008. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e

detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase- negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciê. Rur.** 38, 1346-1350.

Taponen, S., Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Vet. Microbiol.** 134, 29-36.

Vesterholm-Nielsen, M., Larsen, M.O., Olsen, J.E., Aarestrup, F.M. 1999. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Vet. Scand.** 40, 279-86.

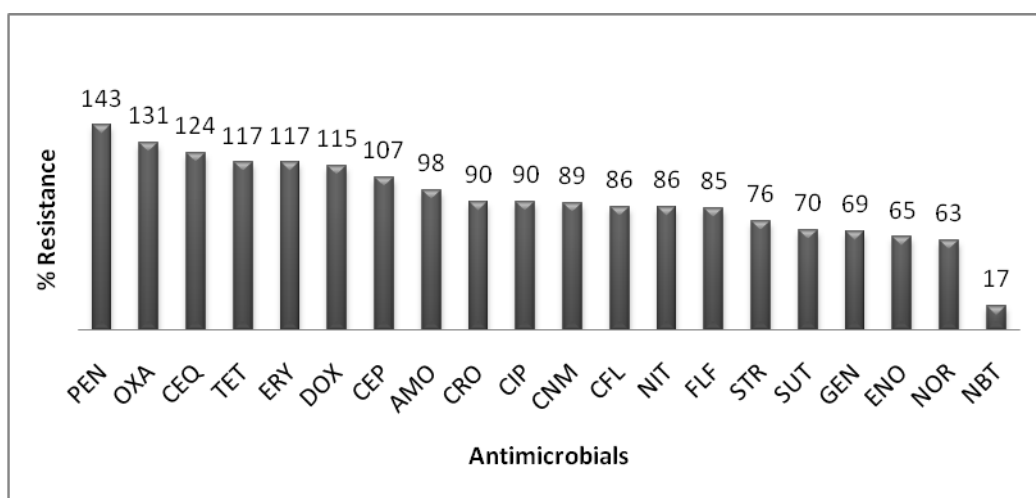


Figure 1 - Number of resistant *Staphylococcus* spp. isolates in disk diffusion test.

Where: PEN: penicillin; AMO: amoxicillin OXA: oxacillin; CEQ: cefquinome; CNM: cephalonium; CIP: ciprofloxacin; ENO: enrofloxacin; ERY: erythromycin; FLF: florfenicol; GEN: gentamicin; NBT: tetracycline + neomycin + bacitracin; CEP: cephalothin; STR: streptomycin; TET: tetracycline; NOR: norfloxacin; CRO: ceftriaxone; NIT: nitrofurantoin; DOX: doxycycline; CFL: cephalexin; SUT: sulphazotrin.

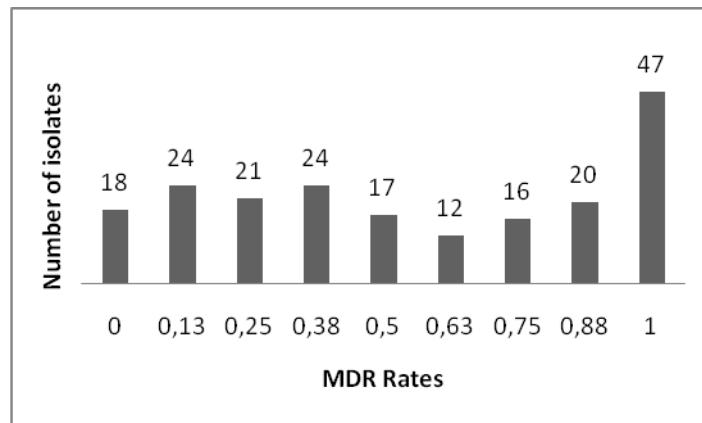


Figure 2 - MDR rates of *Staphylococcus* spp. isolates from Brazilian buffaloes.

Table 1. Distribution of resistance genes according to multi drug resistance rates in *Staphylococcus* spp. from buffalo mastitis in Brazil.

MDR Rates	<i>blaZ</i> + <i>mecA</i> +	<i>blaZ</i> - <i>mecA</i> -	<i>blaZ</i> + <i>mecA</i> -	<i>blaZ</i> - <i>meCA</i> +
0	0	11	7	0
0,13	0	17	7	0
0,25	0	16	5	0
0,38	2	13	9	0
0,5	1	9	7	0
0,63	0	8	4	0
0,75	1	8	6	1
0,88	1	12	7	0
1	4	24	18	1
Total	9	118	70	2

MDR: Multi drug resistance

Veterinary Microbiology

An International Journal



ISSN: 0378-1135
Imprint: ELSEVIER

Guide for Authors

An International Journal

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Reviews of topics in veterinary bacteriology, mycology and virology should provide short, readable, well-referenced, up-to-date overviews of current, emerging, or neglected subjects in the discipline. Syntheses of information from diverse sources, providing clarification of areas of confusion or uncertainty, are especially desirable. It is anticipated that these reviews will provide overviews of important topics to the benefit of curious-but-busy readers of Veterinary Microbiology.

Reviews should carry titles which are creative and provocative, but nonetheless descriptive, and emphasize current status and future directions of research. Historical vignettes are useful in setting the stage for addressing important contemporary questions, but should not ordinarily be the basis for an article. Manuscripts may include controversial views, if presented in balanced fashion and supported by evidence; informed speculation is welcome. For reasons of credibility, it is preferred that reviews be written by authors from more than one research center.

Authors may find it useful to contact the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu), perhaps with an outline of a proposed review, before submitting. Articles should be about fifteen pages of double-spaced type, supported by

illustrative material. Figures are welcomed and articles should not have more than 50 references. Manuscripts should be submitted through the EES electronic submission system, taking care to clearly indicate that it is a review article.

Manuscripts will, where possible, be fast-tracked for publication, but will go through the normal review procedure. Final decisions on bacteriology and mycology topics will be handled by Glenn Songer and for virology by Uwe Truyen.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the

conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should

contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions
⇒ <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have (**numbered lines**) with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the

dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:
⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web

products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed– if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates –publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should he listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
 - c. *For books*
Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.
 - d. *For multi-author books*
Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should he added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage ⇨ <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit ⇨ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from

⇨ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to

annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:

☞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage

☞ <http://www.elsevier.com/locate/vetmic> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

***Veterinary Microbiology* has no page charges**

ARTIGO 3

**RISK FACTORS ASSOCIATED TO BUFFALOES MASTITIS IN THE
BRAZILIAN NORTHEAST**

RISK FACTORS ASSOCIATED TO BUFFALOES MASTITIS IN THE BRAZILIAN NORTHEAST

E. S. de Medeiros*, M. F. L. de Freitas[†], T. N. Saukas*, S. S. Azevedo[‡], J. W. Pinheiro Junior[§]; D. F. Brandespim[§]; O. L. de Souza Neto* and R. A. Mota^{1*}

*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

[†]Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, *Campus* Vitória, Vitória, PE, Brasil

[§]Departamento de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil

[‡]Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil

^{1*}Corresponding author. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE

51171-900, Brazil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

ABSTRACT – Risk factors for subclinical mastitis were studied in 474 female buffaloes proceeding from four dairy farms located in the states of Pernambuco, Alagoas, Bahia and Ceará. Milk samples (n=1,896) of lactating female buffaloes were examined for somatic cells count (SCC) and microbiologic exam, and a questionnaire composed by objective questions was applied in order to obtain animals and herd management data. Risk factors analysis was performed in two stages: univariate and multivariate analysis. Two analysis were performed, one considering the animal classification for SCC as the dependent variable (<400,000 – negative; >400,000 – positive) and another, considering the microbiologic exam result (positive and negative). In the multivariate analysis considering SCC as dependent variable, the lack of teat washing was the only variable identified as a risk factor, so that farms without this procedure before the milking presented risk of infection of 2.68 (I.C. 1.49 – 4.83). In the multivariate analysis considering the microbiologic exam as dependent variable,

it was observed that properties that performed the cleaning of the milking equipment manually presented risk of 1.85 (I.CI. 1.32 – 3.64), which was higher than those properties that performed the cleaning mechanically (p=0.019). Risk factors for the occurrence of subclinical mastitis in dairy buffaloes in Brazilian Northeast farms were related to the characteristics of improper milking management. Risk factors identified in this study must be carefully corrected in order to reduce the frequency of mastitis cases, and therefore, contribute for disease control and prevention in the herds.

Key Words: buffaloes, mastitis, milking, risk factor

INTRODUCTION

Buffaloes present the same sanitary problems as bovine, stressing mastitis, which is considered the disease that affects the most the profitability of dairy farms, from production losses as much as to the annual costs in prevention and treatment. The disease interferes directly in the milk quality and countless efforts have been made for its control and prevention (PEDRINI; MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005 CARVALHO et al., 2007). It is an illness of multi-etiological and multifactorial origin that assaults the majority of the world's dairy herd and causes problem in the whole productive chain, even for the consumer, which may receive a final product of low quality (COSTA, 1999).

Factors associated to the handling and characteristics such as herd size and type of milking (manual or mechanic) and procedures during the milking (the lack of disinfection before and after the milking), the improper functioning of the milking machine and the lack of milker's training and motivation were associated to the occurrence of new intramammary infection in bovine cattle, and consequently, the increase of CCS in the milk (OLIVER et al., 1993; BRITO et al., 1998; SPENCER, 2002).

Souza et al. (2005) developed a study on risk factors for bovine mastitis and verified that the methodology of analysis allowed the identification of likely risk factors

for high CCS of the herd and for specific mastitis pathogens likely risk factors identified were the lack of adoption of the milking line, feeding animals during the milking procedure and the lack of teat antiseptics after milking.

Coentrão et al. (2008) found as risk factors for subclinical mastitis, animals with the base of the udder along or below the hocks, cracks or fissures in the rubber parts of the milking machine, unsuitability of the teat holders, cleaning deficiency of the pulsators, lack of the milker's training, not using the microbiologic diagnostic for mastitis, immersion of the teat holders set in disinfectant solution between the milking of distinct animals and total insertion of the antibiotic cannula into the teats at the cow drying.

In Brazil, published papers on risk factors in ruminants are still scarce. For the bubaline species, no references were found on this subject in the consulted literature. Hence, the aim of this work was to identify the risk factors associated to subclinical mastitis in bubaline herds in Northeastern states of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

One thousand eight hundred and ninety six milk samples from 474 buffaloes proceeding from four dairy farms located in the states of Pernambuco, Alagoas, Bahia and Ceará were analyzed. Herds were composed of Murrah crossbred animals at different ages and at different lactation stages. Animals were raised under intensive or semi-intensive management and submitted to canalized mechanic milking and bucket milking.

Milk samples were submitted to California Mastitis Test (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) and positive samples were collected for somatic cells count (SCC) in appropriate flasks containing the preservative Bronopol®, and immediately

cooled. SCC was performed in electronic equipment SomaCount 300, by the flow cytometry method (MILK, 1995).

Sample collection for the microbiologic exam was performed after previous teat washing with water and soap, drying with towel paper and ostium antiseptis with alcohol 70°GL. Five mL of milk were collected in sterilized flasks with threaded caps, previously identified with the name or number of the animal and mammary quarter, properly sent to the laboratory in isothermal boxes containing recyclable ice for processing.

Aliquots of 10µL of milk were seeded in agar base enriched with 5% of sheep blood and incubated in bacteriological oven at 37°C, performing reading after 24, 48 and 72 h. Further, the morphologic characteristics of colonies as size, type, color and hemolysis were observed. Cell arrangement and morphotinctorial characteristics to the Gram technique were observed at the microscopy (CARTER, 1988).

Classification of Gram-positive bacteria was performed according to Quinn et al. (1994). For the identification of the *Staphylococcus* spp isolates, biochemical proofs were developed as production of free coagulase, DNase and catalase, according to Silva et al. (1997). Proofs for acetoin production, fermentation of glucose (anaerobiosis) and manitol (aerobiosis and anaerobiosis) were performed according to Mac Faddin (1980). After the tests, isolates were classified as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), if positive in every test; as *Staphylococcus* coagulase-positive (SCP), if positive for the coagulase production, glucose fermentation in anaerobiosis and catalase, but negative for any other test; as *Staphylococcus* coagulase-negative (SCN), when bacteria could not coagulate the rabbit plasma, presented staphylococcus characteristics at the Gram staining technique, fermented glucose in anaerobiosis and produced catalase (BAIRD-PARKER, 1990).

For the enterobacteria identification, the following biochemical proofs were applied: urease production, reaction in Triple Sugar Iron (TSI) Agar, test of MR/VP (MR – Methyl Red reaction; VP - Voges-Proskauer reaction), test in Agar SIM (S - H₂S production; I – Indole production; M - motility) and test in citrate agar (citrate's carbon utilization), being identified according to Carter (1988).

For the risk factors study, questionnaires were applied to the farms managers, composed by objective questions in order to obtain information about the property (breed characteristic, breeding management, water source, veterinary assistance, type of milking, buffaloes up to the third lactation); milking handling (flies control, strip-cup test, teat washing before milking, dry cow therapy, clinical mastitis treatment, antibiotics shift) and hygiene of milking equipments (time of utilization of the milking equipment, cleaner utilization, cleaning of the milking equipment, milker's hygiene habits).

Risk factors analysis was performed in two stages: univariate and multivariate analysis. In the first analysis, the animals' classification for SCC was considered as the dependent variable (<400,000 – negative; > 400,000 – positive) and in the second analysis, the microbiologic exam result (positive and negative) was considered as the dependent variable. Variables presenting p value ≤ 0.15 in the chi-square or the Fisher's exact test when indicated (ZAR, 1999) were selected and used in the multivariate analysis, by using the multiple logistic regression (HOSMER; LEMESHOW, 2000). Collinearity among predictor variables was verified by correlation analysis and for those that presented strong collinearity ($p < 0.05$), one of them was excluded from the multiple analysis according to the biologic plausibility (DOHOO et al., 1996). Significance level adopted in the multiple analyses was 5%. Analyses were developed by using the program SPSS 13.0 for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

By analyzing the farms' productive profile, it was observed that all farmers were raising buffaloes for over than five, with the predominance of the Murrah breed, with 50% of pure animals and 50% crossbred. Predominant breeding system was semi-intensive (75%), followed by the intensive system (25%). All the farms used mechanic milking, of which 75% presented the bucket milking system and 25%, the canalized system.

In the univariate analysis, considering the somatic cell count as the dependent variable, the variables identified as risk factors associated to SCC higher than 400,000 cells/mL were: type of milking, number of lactations, teat washing, antiseptis, dry cow therapy, clinical mastitis treatment, antibiotics shift, time of equipment utilization and milker's habit (table 1). However, in the multivariate analysis, it was observed that only the variable lack of teat washing before milking was confirmed as risk factor for the mammary gland infection with OR= 2.68 (I.C. 1.49 – 4.83).

Table 1. Univariate analysis results for the factors associated or not to bubaline mastitis considering the somatic cells count in buffaloes milk

Variable	Total of animals	Positive		p
		N	%	
Breed				
Pure	88	47	53.4	
Crossbred	230	119	51.7	0.888
Breeding system				
Intensive	69	37	53.6	
Semi-intensive	249	129	51.8	0.896
Water source				
Still	69	37	53.6	
Still + running	249	129	51.8	0.896
Veterinary assistance				
Permanent	88	47	53.4	
Temporary	230	119	51.7	0.888
Type of milking				
Mechanic bucket milking	153	93	60.8	
Mechanic canalized	165	73	44.2	0.005*
Buffaloes up to 3 rd lactation (%)				

0 – 59	165	73	44.2	
≥ 60	153	93	60.8	0.005*
Flies control				
Yes	88	47	53.4	
No	230	119	51.7	0.888
Strip-cup tes				
Yes	299	156	52.2	
No	19	10	52.6	1.000
Teat washig before milking				
Yes	253	120	47.4	
No	65	46	70.8	0.001*
Antisepsis of teats before milking				
Yes	153	93	60.8	
No	165	73	44.2	0.005*
Antisepsis of teats after milking				
Yes	230	119	51.7	
No	88	47	53.4	0.888
Dry cow therapy				
Yes	65	46	70.8	
No	253	120	47.4	0.001*
Clinical mastitis treatment				
Yes	253	120	47.4	
No	65	46	70.8	0.001*
Antimicrobial shifts				
Yes	184	83	45.1	
No	134	83	61.9	0.004*
Time of milking equipment utilization				
Up to 4 anos	165	73	44.2	
≥ 5 anos	153	93	60.8	0.004*
Cleaner utilization				
Yes	249	129	51.8	
No	69	37	53.6	0.896
Milking equipment cleaning				
Automatic	165	73	44.2	
Manual	153	93	60.8	0.005*
Milkers training				
Sim	69	37	53.6	
Não	249	129	51.8	0.896
Milkers hygiene habits				
Proper	153	93	60.8	
Improper	165	73	44.2	0.005*

* Variables selected and used in the multiple logistic regression ($p < 0.15$)

Concerning the univariate analysis and considering the microbiologic exam as dependent variable, the variables pure breed, type of milking, number of lactations, flies control, lack of strip-cup test, antisepsis before and after milking, antibiotics shift, time

of equipment utilization, manual cleaning of the milking equipment and milker's habit were considered as risk factors associated to the positivity in the microbiologic exam (Table 2). In the multivariate analysis, it was observed that properties that performed the manual cleaning of the milking equipment presented OR= 1.85 (I.C. 1.32 – 3.64), which represents greater chances of occurrence of subclinical mastitis in comparison to those properties that performed this cleaning mechanically (p=0.019).

A few factors associated to the mastitis occurrence, as much in the SCC elevation, as in the microbiologic exam must be stressed in this study, because although most of them were not confirmed by the multivariate analysis, they may serve as mastitis indicators in herds and must be corrected, taking into account that they were previously reported as important factors for this disease for the bovine species.

In Brazil, few papers were published on risk factors associated to the occurrence of mastitis in bovine. For the bubaline species, no references were found so far about this subject in the consulted literature.

According to Coentrão et al. (2008), the somatic cells count (SCC) in the milk is the most used indicator in programs for mastitis control and prevention around the world. Several factors might influence the SCC variation, being mentioned parturition order, lactation period, month and season of the year (SCHEPERS et al., 1997; LAEVENS et al., 1997; SOUZA et al., 2005b; CUNHA et al., 2008). However, the occurrence of intramammary infection is the main factor responsible for the SCC variation (HARMON, 1994).

Previous epidemiologic studies on risk factors identified characteristics related to the animal, to the environment, to the handling procedures and to the milking equipment, associated to bovine mastitis and SCC variation (PEELER et al., 2000; OTT; NOVAK, 2001; BERRY; HILLERTON, 2002; SOUZA et al., 2005a).

Table 2. Results of the multivariate analysis for the factors associated or not to the bubaline mastitis considering the microbiologic exam of buffaloes milk

Variable	Total of animals	Positive		P
		N	%	
Breed				
Pure	88	72	81.8	
Crossbred	230	156	67.8	0.019*
Breeding system				
Intensive	69	53	76.8	
Semi-intensive	249	175	70.3	0.360
Water source				
Still	69	53	76.8	
Still + running	249	175	70.3	0.360*
Veterinary assistance				
Permanent	88	72	81.8	
Temporary	230	156	67.8	0.019
Type of milking				
Mechanic bucket milking	153	122	79.7	
Mechanic canalized	165	106	64.2	0.003*
Buffaloes up to 3 rd lactation (%)				
0 – 59	165	106	64.2	
≥ 60	153	122	79.7	0.003*
Flies control				
Yes	88	72	81.8	
No	230	156	67.8	0.019*
Strip-cup tes				
Yes	299	209	69.9	
No	19	19	100.0	0.010*
Teat washig before milking				
Yes	253	178	70.4	
No	65	50	76.9	0.371
Antisepsis of teats before milking				
Yes	153	122	79.7	
No	165	106	64.2	0.003*
Antisepsis of teats after milking				
Yes	230	156	67.8	
No	88	72	81.8	0.019*
Dry cow therapy				
Yes	65	50	76.9	
No	253	178	70.4	0.371
Clinical mastitis treatment				
Yes	253	178	70.4	
No	65	50	76.9	0.371
Antimicrobial shifts				
Yes	184	125	67.9	
No	134	103	76.9	0.105*
Time of milking equipment				

utilization					
Up to 4 anos	165	106	64.2		
≥ 5 anos	153	122	79.7	0.003*	
Cleaner utilization					
Yes	249	175	70.3		
No	69	53	76.8	0.360	
Milking equipment cleaning					
Automatic	165	106	64.2		
Manual	153	122	79.7	0.003*	
Milkers training					
Sim	69	53	76.8		
Não	249	175	70.3	0.360	
Milkers hygiene habits					
Proper	153	122	79.7		
Improper	165	106	64.2	0.003*	

* Variables selected and used in the multiple logistic regression ($p < 0.15$)

According to the results obtained in the multivariate analysis considering SCC as dependent factor, it was observed that the lack of teat washing before the milking was the most important factor identified. It is known that the teat washing is of major importance for the mastitis control, since this measure removes the dirtiness and reduces the infectious agents present in the teats. Another measure that must be performed associated to the washing is the teat drying with individual towel paper and the teat disinfection before and after milking. For buffaloes with aquatic habits, teat washing before milking must be considered as protection measure to prevent the mammary gland infection. Yet, the milker's training for inspection, washing and disinfection of the teats before milking is indicated, mainly in farms where animals remain in grasslands with flooded and muddy areas. This characteristic was observed in every property visited in this study. Yet on this subject, Coentrão et al. (2008) identified in a study with the bovine species that the second greater risk identified was the inexistence of training programs for milkers to perform the milking. In farms where the milkers did not receive any kind of training, as explanations about proper procedures during the milking, utilization and maintenance of the milking equipment, examination of the first

squirts of milk in every quarters or to proceed the "California Mastitis Test", animals presented 2.51 times more chances of presenting SCC above 200.000 cells/mL. In the farms evaluated by this study, it was observed that milkers did not receive training for the hygienic milking and mastitis prevention. Only in one farm visited, milkers received such orientation, although they did not use the teaching, since the training was punctual and the staff responsible for the milking did not present any interest for the adoption of these measures, because, according to them, this procedure delays the time of milking.

Souza et al. (2005) also performed a study on risk factors for bovine mastitis in herds in the Zona da Mata, State of Minas Gerais. Variables used in the final models that presented risk (OR) above 2.0 and with $P \leq 0.10$ were: lack of teats antiseptics after milking, providing feed during the milking procedure, lack of adoption of milking line and interactions between lack of adoption of a milking line and lack of teat antiseptics after milking with the providing feed during milking procedure. The lack of disinfection before milking and the lack of warm water utilization or the lack of training the milkers presented OR of 7.62. The authors concluded that the factors associated to high SCCLT were the lack of adoption of a milking line, the feeding during the milking and the lack of teat antiseptics after milking. Authors also discussed about the need of getting individual data of SCC or the microbiologic exam in order to identify the risk factors of a herd or an extract inside this herd. Coentrão et al. (2008) identified as risk factors for subclinical mastitis in cows: animals with the udder base along or below the hocks, cracks or fissures in the rubber parts of the milking equipment, unsuitability of the teat holders, cleaning deficiency of the pulsators, lack of the milker's training, not using the microbiologic diagnostic for mastitis, immersion of the teat holders set in disinfectant solution between the milking of distinct animals and total insertion of the antibiotic cannula into the teats at the cow drying.

In the multivariate analysis considering the microbiologic exam, it was observed that the manual cleaning of the milking equipments was the main factor identified in this study. According to literature data, farms that adopt the manual cleaning of the milking equipments must do it so carefully, in such a way that no milk residues or dirtiness remain in it. Another important subject in this cleaning is the utilization of adequate solutions and in sufficient quantities (COSTA et al. 1998; AMARAL, 2004; MEDEIROS et al., 2009). Yet, it is important to emphasize the need to develop an adequate training of the workers, so they would be able to perform the post-milking activities carefully, in order to reduce the mastitis risks in the herds, and not only provide care and attention during the milking procedure.

CONCLUSION

Risk factors for the subclinical mastitis occurrence in dairy buffaloes in farms of the Brazilian Northeastern region are related to characteristics of improper milking handling, as the lack of teat washing and the manual washing of the milking equipments. Although the employed methodology do not identify all factors associated to subclinical mastitis, risk factors identified in this study must be carefully corrected in order to reduce the frequency of mastitis cases and, thus, to contribute for the control and prevention of this disease in herds.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.A et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, out./dez. 2004

AMARAL L.A. et al. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4 p. 173-177, out./dez. 2004.

BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **J. Appl. Bacteriol.**, Supp. v.19, p. 15-85, 1990.

BERRY, E.A., HILLERTON, J.E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.112-121, 2002.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; VEIGA, V.M.O. et al. Udder infection patterns in hand and machine milked dairy herds under subtropical conditions. In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998, Merida. **Proceedings...** Merida, 1998. p.148-151.

CARTER, G.R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo: ROCA 1988. 250p.

CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v.59, n.1, p. 242-245, 2007

COENTRÃO C.M., SOUZA G.N., BRITO J.R.F. , PAIVA B.M.A.V., LILENBAUM W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.283-288, 2008

COSTA E. O. et al. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina **Rev. Napgama**, São Paulo ano 1 n. 1 p. 18-22 out.1998.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.V. et al. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número e lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, p.19-24, 2008.

DOHOO, I. R.; DUCROC, C.; FOURICHON, C.; DONALD, A.; HURNIK, D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. **Prevent. Vet. Med.**, v. 29, p. 221-239, 1996.

FREITAS, M.F.L. et. al. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, v.77, p.2103- 2113, 1994.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375 p.

LAEVENS, H.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y.H. et al. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.3219-3226, 1997.

MILK: enumeration of somatic cells. Bulletin of international dairy federation. N. 148A, 8p. 1995.

MEDEIROS E. S., SANTOS M. V., PINHEIRO JÚNIOR J. W., FARIA E. B., WANDERLEY G. G., TELES J. A. A. E MOTA R. A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina **Pesq. Vet. Bras.** 29(1):71-75, janeiro 2009

OLIVER, S.P.; LEWIS, M.J.; INGLE, T.L. et al. Prevention of bovine mastitis by a premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p.287-292, 1993.

OTT, S.L.; NOVAK, P.R. Association of herd productivity and bulk-tank somatic cell counts in US dairy herds in 1996. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.218, p.1325-1329, 2001.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, out./dez., 2003

PEELER, E. J.; GREEN, M. J.; FITZPATRICK, J. L. et al. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.2464-2472, 2000.

QUINN P. J., CARTER M. E., MARKEY B. K. & CARTER G. R. Mastitis, p. 327- 44. In: **Clin. Vet. Microb.** Wolfe Publishing, London. 1994.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 130, n. 5, p.199-207, 1957.

SCHEPERS, A.J.; LAM, T.J.G.M.; SCHUKKEN, Y.H. et al. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1833-1840, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997, pg.295

SOUZA G.N.; BRITO J.R.F.; MOREIRA E.C.; BRITO M.A.V.P., BASTOS R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl. 2, p.251-260, 2005

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. et al. Fontes de variação para a contagem de células somáticas em vacas leiteiras. In: CARVALHO, L.A.; ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C. et al. Tecnologia e gestão na atividade leiteira. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005a. p.121-135.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. et al. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da

Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl.2, p.251-260, 2005b.

SPENCER, S.B. Equipamento de ordenha X controle de mastite e qualidade do leite.
In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p.119-148.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.



Journal of Dairy Science® Instructions to Authors¹

Editorial Policies and Procedures

The American Dairy Science Association® (ADSA®) invites scientists from the global community to submit papers for consideration to the *Journal of Dairy Science*. Authors need not be members of ADSA.

These instructions detail the form and style required by the *Journal of Dairy Science* (JDS) for papers submitted for publication. Papers that do not follow the form and style of the journal may be rejected without review. It is recommended that authors refer to these instructions when preparing manuscripts, when incorporating requested changes into revisions after review, and when checking author proofs.

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Gary W. Rogers, Geno Global Ltd., 2153 Buck Hollow Rd., New Market, TN 37820; phone: 865-471-1566 or 865-680-4208; e-mail: grogers200@yahoo.com.

For assistance with Manuscript Central, Manuscript Submission/Copyright forms, and page charge/offprint orders contact Jeremy Holzner, Editorial Assistant, Headquarters Office, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822; FAX (217) 378-4083; jeremyh@assochoq.org.

For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, Managing Editor, Headquarters Office, American Dairy Science Association, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822; phone (217) 356-7641; FAX (217) 378-4083; journals@assochoq.org.

Care and Use of Animals

All research animals should be acquired, retained, and used in compliance with federal, state, and local laws and regulations. The authors should state explicitly that IACUC (or equivalent) approval was obtained before commencement of the study. Authors should make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments should be conducted in

accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*, 3rd ed. (available from Federation of Animal Science Societies, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822 <http://www.fass.org/>). Methods of killing experimental animals must be described in the text. When describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified.

Types of Articles

Full-Length Research Papers. The majority of papers published in JDS are full-length research articles. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts and methods, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in the journal must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

In addition to full-length research papers, the following types of articles appear in the journal:

Our Industry Today. The Our Industry Today section includes interpretive applied summaries and recommendations from research that are useful to the dairy industry. Syntheses and applications from technical reports that contribute to solutions of problems in the dairy industry especially are solicited. Authors of reports for extension education of the nonscientist are encouraged to share their contributions with colleagues and to achieve larger circulation of their conclusions and recommendations through this section. In addition, papers that report on advances in teaching and outreach techniques are suitable for this section. The organization of papers for Our Industry Today may vary but should be logical and effective; an abstract is required. All other style and form instructions apply.

Hot Topics. Papers submitted for this section must report on a completed experiment testing a timely, original hypothesis of importance to an area of dairy science. The work may be preliminary in nature, but with sufficient data so that the hypothesis is clearly tested. Results may point to avenues for fruitful, in-depth analyses. Reports must contain an explicitly stated hypothesis and objectives, with sufficient detail in methodology for repetition of the work, as well as a

¹Revised December 2009.

results section, a brief discussion, and references. Total page limits for text, tables, figures, and references must be no more than 4 journal pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). The manuscript should contain a title and short abstract but not separate sections. The total number of tables and figures should be no more than 3; references should be minimal. The first page must have HOT TOPICS in capital letters on the header line.

These papers will be given priority for publication. An effort will be made to notify authors of a decision within 1 mo of the date of receipt. Once accepted, the paper should be published within 3 mo.

Short Communications. Short communications are reports of limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance to some area of dairy science. The manuscript, which should be no more than 4 journal pages in length (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures), should contain a title and short abstract but not separate sections. "Short communication:" should precede the title on the title page of the manuscript. The manuscript may report negative results. Reports must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.

Technical Notes. Papers in this section should report a method that is useful to some aspect of dairy science. Submissions should include a brief justification for the technique, be it new or an improvement on a previously published technique. The report should state a hypothesis, include a full description of procedures that can be repeated by researchers, and include explicit controls to indicate sensitivity, precision, and accuracy of the technique.

If the technique is an improvement on an existing technique, sufficient comparison of the previous technique should be included, and mean and dispersion information must be included. The page limit is 4 printed pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). Use of tables, figures, and references should be minimized. The manuscript should contain a title and short abstract but not separate sections. Requests for longer Technical Notes may be made to the senior editor and editor-in-chief, but justification for a longer report will be required.

Nucleic Acid Sequences. The section on nucleic acids sequences is suitable for data that are not appropriate for a full paper but that are useful to other scientists. The section is not intended for data that will be published in full elsewhere, nor is the section a repository for nucleic acid sequence information; the reported sequence must address basic questions of structural or functional interest. Authors should be aware that

publication of sequences or description of molecular clones places them in the public sector. Sequences published must relate to dairy cattle, dairy products, or dairy pathogens and microorganisms. Manuscripts dealing with comparative analyses of sequences may be considered if the genes are relevant to dairy science. Sequences of cDNA or genes for which gene products are not relevant to dairy science are not acceptable. All DNA sequences should be accompanied by a statement indicating that both strands have been sequenced with appropriate overlapping sequence runs. Sequences should be presented at a maximum of 100 characters per line.

Acceptance for publication of sequencing data is contingent on the submission to one of the databases (e.g., GenBank, EMBL Data Library). Accession number and name and address of the database should be stated in a footnote to the article title. Sequence data are peer-reviewed, but publication is rapid.

The format for publication of nucleic acids sequences is name of sequence, species in which the sequence was determined, origin of the clone, evidence that a protein is produced from the DNA, sequencing method (both strands must be sequenced with appropriate overlapping sequence runs), submission number (or accession number) to EMBL data bank (or GenBank), comments, and references. Sequences not accompanied by an EMBL Data Library (GenBank) accession number will be returned to the authors.

Invited Reviews. The mechanism for consideration of invited reviews is to encourage additional publication (~10 to 12 per year) of invited reviews in all sections of the journal. Section editors will advise the editor-in-chief on suggested reviewers and justification for the review. The editor-in-chief will make the invitation and the invited reviews editor will ensure the quality of the review. The first 10 printed pages of an invited review are published at no cost to the author.

Authors of symposium papers and invited papers presented at the joint annual meeting of ADSA/American Society of Animal Science may be selected to contribute invited review papers.

Letters to the Editor. Short (300 words) letters to the editor on topics of concern to readers, including comment on publications with rebuttals from authors if needed, may be submitted to the editor-in-chief or to any of the editors. The letters should be titled, and the title and running head should include "Letter to the editor." Letters will be published at the discretion of the editor-in-chief. Authors of letters are subject to the same copyright release requirements as other authors. Letters are published at no charge to the author(s).

Biographical Sketches. Occasionally, retiring or past scientists and educators should be subjects of

biographical essays, both as a small honor to them and as an example and history for other readers. This section brings a sense of maturity and completeness to our field. Individuals who wish to submit biographical sketches should contact the editor-in-chief or one of the editors for additional instructions.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online at Manuscript Central (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Detailed instructions for submitting electronically are provided online (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Authors who are unable to submit online should mail one copy of the manuscript and a disk with all manuscript materials (text, figures, and tables; preferably saved as a Microsoft Word file) to Jeremy Holzner, Editorial Assistant, American Dairy Science Association, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822. Staff at ADSA headquarters will post manuscripts by proxy, but authors who submit by mail should be aware that delays might occur in the review process.

Copyright Agreement

Data (including graphs, figures, tables, and illustrations) must not have appeared in print elsewhere except as abstracts, local or regional field day reports, extension letters, or non-peer-reviewed, noncopyrighted proceedings of conferences. Material submitted to JDS should not be submitted for publication to popular magazines, company advertisements, or organizational proceedings until the author has received notification of acceptance of the manuscript. Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review, and the senior author should have authorization to publish. All coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

The Manuscript Submission and Copyright Release form (published in issues of the journal and available from the journal web site: <http://www.journalofdairyscience.org/>) should be submitted for each paper; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form; manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of all coauthors. Authors who are not permitted to release copyright must still return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

Requests to reproduce material published in JDS must be made through Elsevier's Rights Department (healthpermissions@elsevier.com), online via the

Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>), or via the Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com>). The Association grants to the authors the right of republication of their own material in any book, thesis, or dissertation of which they are authors or editors subject only to giving proper credit in the book to the original JDS publication. In addition, authors may post abstracts of manuscripts on the web at the time of submission. Once an author receives notification of acceptance, the peer-reviewed, pre-typesetting manuscript can be posted to the author's website. Authors may deposit their peer-reviewed, pre-typesetting manuscript into a repository upon payment of the open access fee (see page 4 of these instructions). For more information, read the "Terms and Conditions" pages at <http://www.journalofdairyscience.org/>.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Upon submission to JDS, a manuscript is assigned to an editor, who enlists reviewers to assist in the evaluation of the manuscript. The review process is confidential, which infers a bond of trust among the authors, editor, and reviewers. The editor is trustee of the manuscript until the review process is completed and ensures that the review process is fair, thorough, and confidential. Reviewers are asked not to share the contents of the manuscript with anyone, except that they may ask a colleague to assist with the review with approval of the editor. Communication with authors should only be through the editor. Reviewers should notify the editor of conflicts of interest that may compromise their ability to provide a fair and unbiased review. Moreover, they must recognize their responsibility in maintaining the confidential nature of the review. Authors should suggest names of appropriate reviewers when submitting the manuscript to streamline the review process and may list reviewers whom they consider unacceptable because of potential bias. These recommendations will be considered by the editor when assigning reviewers. Authors should read the statement on publication ethics, *Journal of Dairy Science* 68:3124.

A reviewed paper returned to authors for revision must be returned to the editor within 6 wk. If not, the paper may be treated as a new submission. Under unusual circumstances, editors may extend the revision deadline beyond 6 wk.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded by the section editors to the editorial office for technical editing and typesetting. At this point the technical editor may

contact the authors for missing information or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures reproduced, and author proofs prepared.

Proofs

Author proofs will be sent by e-mail (in PDF format) to the corresponding author. Although the proof appears in a 2-column page format, it should be considered a galley proof; page layout may change when the article is paginated into an issue. Author proofs should be read carefully and checked against the typed manuscript, because responsibility for proofreading lies with the authors. Corrections may be returned by fax, mail, or e-mail. The Comments feature in Adobe Acrobat or Adobe Reader may be used to insert changes and comments within the proof PDF. For faxed or mailed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. If extensive editing is required, corrections should be provided on a separate sheet of paper with a symbol indicating location on the proof. Changes sent by e-mail to the technical editor must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Author queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication.

Proof corrections should be made and returned to the technical editor within 3 days of receipt. Publication cannot proceed until proofs are returned. Contact a technical editor at journals@assoqh.org if you have questions about the proof correction process.

Publication Costs

The *Journal of Dairy Science*® offers two options for publication of articles: Standard Page Charges and Open Access.

Standard Page Charges: The current charge for publication is \$85 per printed page in the journal for articles if at least one author is a professional member of ADSA. If no authors are ADSA members, the publication charge is \$140 per journal page. The cost to publish a color figure is \$995 (per figure) plus an offprint surcharge. There is charge for all offprints and reprints. An offprint order form will be sent to the corresponding author with the author proof.

Open Access: Under the new open access (OA) policy, authors may choose to pay the OA fee in lieu of standard page charges when author proofs are returned so that their paper becomes freely available upon publication in an online issue. The OA fee is \$1750 if at least one author is a professional member of ADSA or \$3500 if no authors are ADSA members. Open access

articles will be freely accessible through the journal's web site (<http://www.journalofdairyscience.org/>) at the time of publication. All other (non-OA) articles become freely available without a subscription 12 months after publication.

Articles for Deposit: Author(s) publishing articles under open access shall bear sole responsibility for meeting the specific posting requirements of their funders. Upon payment of the OA fee, authors may deposit the accepted (peer-reviewed pre-typeset only) manuscript in a repository. The embargo period before deposit in a repository is 12 months (or as specified by the funder) after publication in a journal issue.

By signing the Manuscript Submission and Copyright Release Form at the time of submission, the authors agree to bear responsibility for payment of publication charges. Invoices for publication charges will be issued at the time an issue goes to press (approximately 2 weeks before being posted online). Payment is due within 30 days of receipt of the invoice. The preferred method of payment is by credit card, with credit card details submitted on the page charge form sent out with the author's proof. Payment may be made by check, drawn on a US bank. For payments by wire transfer, contact Vicki Paden at vickip@assoqh.org. **Manuscripts will be withheld from publication for authors with past-due page charge invoice(s) until all prior payment obligations have been met.**

Page Charge Waivers

Authors who must use personal funds to pay for page charges and for whom such charges would entail hardship can request of the editor-in-chief that these charges be waived, under the following conditions: 1) the request must be made in writing **at the time the manuscript is submitted**; 2) the request should be accompanied by a statement from a financial officer or other official from the institution with which the author is affiliated, indicating the reasons why page charges cannot be paid; and 3) if the waiver is granted, the author is expected to become a professional member of ADSA. Only one waiver will be granted per institution per twelve-month period. Authors who request waivers cannot order offprints.

Offprints may be ordered at an additional charge. Offprints will be shipped approximately 1 month after publication of the issue. Invoices for offprints will be sent to the author or institution shown on the page charge and offprint order form. There is a charge for all offprints.

MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM**General**

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 11th ed.*, *Webster's Third International Dictionary*, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format. The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed., published by the Council of Science Editors in cooperation with The Rockefeller University Press.

Authors should prepare their manuscripts in Microsoft Word and upload them using the fewest files possible to facilitate the review and editing processes.

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be typed double-spaced (in Microsoft Word) with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. Special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using Math-Type from Design Science (www.dessci.com). Note that equations created using the new Equation Builder in Microsoft Word 2007 may not be compatible with earlier versions of Word or other software used in our composition system. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Interpretive Summary

All authors of JDS papers should provide an interpretive summary (IS) of 100 words or less that has been written for nonspecialist readers. That summary should consist of a short title, the first author's last name, and a summary, which must include a sentence or two to summarize the project's expected importance, or its economic, environmental, and/or social impact (similar to the CRIS Progress Report Statement for those who must complete that form). Common abbreviations are permitted (those from the JDS Unrestricted list). The summary should appear on top of the first page of the manuscript, before the running head and title. Interpretive summaries will be peer reviewed. At publication, interpretive summaries will appear in a section at the beginning of the journal. The summaries are intended for an audience who may not be familiar with work in

the author's area of expertise and for government or media researchers, and they will provide JDS readers with a brief overview of the research presented in each issue. Authors must make the summary readable by the general public. The goal is to make JDS research more visible to a wider audience and to emphasize its impact.

Headings

Major Headings. Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION), CONCLUSIONS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First Subheadings. First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. The heading is not followed by punctuation. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

Across the top of the title page (first page), indicate a running head (abbreviated title) of 45 characters or less. The running head is centered and all uppercase. Our Industry Today, Hot Topics, and Nucleic Acids Sequences serve as the running heads for those respective article types. Short Communications, Technical Notes, Invited Reviews, and Letters to the Editor use a running head beginning with the appropriate designation (i.e., SHORT COMMUNICATION:) followed by a short title.

The title should be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized and the remainder of the title is lowercase. The title should contain words or phrases used for indexing the article.

Under the title, names of authors should be typed upper and lowercase (e.g., T. E. Smith) and in boldface. Institutional addresses are displayed below the author names; footnotes referring from author names to displayed addresses should be symbols in the following order: *, †, ‡, §, #, ||, and ¶. The full name, mailing address, phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author should appear directly below the affiliation lines on the title page. The corre-

sponding author will be identified by a numbered footnote and e-mail address below the accepted line on the first page of the published article (e.g., ¹Corresponding author: my.name@university.edu). Note that there is no period following the corresponding author's e-mail address. Supplementary address information may be given in footnotes to the first page; use numerals for these footnotes. Acronyms (except USDA) for affiliations are discouraged unless the acronym is the official name. State or provincial postal code abbreviation is not included between city and zip code if the state or province is previously mentioned in the address (see example). Acceptable format is shown below:

J. E. Smith,* R. A. Jones,† and A. T. Peters‡

*Department of Animal Science, and

†Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison 53706

‡Department of Animal Science, Utah State University, Logan 84321

Abstract. Abstracts should be limited to 2,500 keystrokes (i.e., characters plus spaces). The abstract should review important objectives, materials, results, conclusions, and applications as concisely as possible. The abstract disseminates scientific information through abstracting journals and is a convenience for readers. Open the abstract with objectives and make the abstract intelligible without reference to the manuscript. Use complete sentences and standard terms. Limit the use of abbreviations in the Abstract. Refer to the list on the inside front cover of JDS for those terms that should be defined in the abstract. If a term is used less than 3 times in the abstract, it should be spelled out at each use.

Minimize the amount of data in the abstract and exclude statements of statistical probability (e.g., $P < 0.05$). Exclude references to other work because the abstracts will appear online and in indexing services without the reference list.

Key Words. After the abstract, list 2 to 4 key words or phrases; these will be used to create the subject index of JDS. In most instances, these key words should be taken from the title; they should be typed in lowercase letters, and separated by commas. Key words should be singular (e.g., "dairy cow" not "dairy cows").

Abbreviation Key

An abbreviation key will no longer appear in JDS articles. Author-derived abbreviations should be defined at first use in the abstract and again in the body of the manuscript. The abbreviation will be shown in bold type at first use in the body of the manuscript. Refer to the Miscellaneous Usage Notes for more information on abbreviations.

Body of the Paper

The body of the paper should contain an introduction to the problem (questions, objectives, reasons for research, and related literature); materials, methods, experimental design, and procedures; and results, discussion, conclusions, and applications.

Results and discussion may be combined into a single section. If not, the results section should not contain discussion of previously published work. Results and references to tables and figures already described in the results section should not be repeated in the discussion section.

Appendix

A technical appendix, if desired, shall follow the References section. The appendix may contain supplementary material, explanations, and elaborations that are not essential to other major sections but are helpful to the reader. Novel computer programs or mathematical computations would be appropriate. The appendix will not be a repository for raw data.

References

List only pertinent references. No more than 3 references should be needed to support a specific concept. Research papers and reviews should cite a reasonable number of references. Abstracts and articles from non-peer-reviewed magazines and proceedings should be cited sparingly. Citation of abstracts published more than 3 yr ago is strongly discouraged.

Citations in Text. In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that the authors' names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993) with citations listed chronologically and then alphabetically within a year. Where there are more than 2 authors of one article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as: "J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication)." The author's own unpublished work should be listed in the text as "(J. Smith, unpublished data)." Personal communications and unpublished data (including papers under review) must not be included in the references section.

References Section. To be listed in the references section, papers must be published or accepted for publication. Manuscripts submitted for publication can be cited as "personal communication" or "unpublished data" in the text. In the references section, references shall first be listed alphabetically by author(s)' last name(s).

Table 1. Effect of garlic oil, diallyl disulfide, allyl mercaptan, monensin, and lovastatin on a 17-h in vitro batch culture rumen microbial fermentation trial

Item	Treatment ¹						SEM ²
	Control	GAR300	DAD300	ALM300	MON	LOV	
pH	6.6	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	0.01
Apparent disappearance of DM, %	61.0 ^a	50.7 ^b	51.2 ^b	60.4 ^a	53.9 ^b	62.4 ^a	1.11
Fiber digestibility							
NDF, %	56.8 ^a	44.3 ^b	41.4 ^b	55.9 ^a	39.3 ^b	60.0 ^a	1.73
ADF, %	53.7 ^a	36.8 ^b	34.9 ^b	52.5 ^a	30.7 ^b	57.0 ^a	2.03
Gas, μ mol	4,674.8 ^d	3,756.9 ^d	3,359.7 ^d	4,388.2 ^{ab}	4,009.6 ^{bc}	4,673.1 ^d	123.34
CH ₄ , μ mol	417.3 ^a	110.1 ^d	131.3 ^d	335.9 ^b	241.7 ^c	396.3 ^a	21.56
Total VFA, mM	49.3 ^a	39.7 ^c	38.8 ^c	45.4 ^b	45.7 ^{ab}	48.4 ^{ab}	1.17
Individual, mol/100 mol							
Acetate	61.2 ^a	54.3 ^d	53.9 ^d	58.3 ^b	56.4 ^c	61.1 ^a	0.53
Propionate	22.6 ^d	25.8 ^c	28.3 ^b	22.8 ^d	34.2 ^a	22.8 ^d	0.78
Butyrate	12.5 ^c	16.5 ^a	14.0 ^{bc}	15.0 ^{ab}	6.6 ^d	12.4 ^c	0.60
Branched-chain VFA	2.0 ^a	1.7 ^b	1.7 ^b	2.0 ^a	1.4 ^c	2.0 ^a	0.10
C2:C3	2.7 ^a	2.1 ^b	1.9 ^c	2.5 ^a	1.6 ^d	2.7 ^a	0.07
CH ₄ (μ mol):VFA (μ mol)	0.20 ^a	0.05 ^d	0.07 ^{cd}	0.15 ^{ab}	0.10 ^{bcd}	0.17 ^{ab}	0.00
N-NH ₃ , mg/100 mL	16.7 ^{ab}	16.6 ^{bc}	19.0 ^a	17.2 ^{ab}	14.4 ^c	16.4 ^{bc}	1.10

^{a-d}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Treatments: GAR300 = 300 mg/L *Allium sativa* (garlic oil); DAD300 = 300 mg/L diallyl disulfide; ALM300 = 300 mg/L allyl mercaptan; MON = 12.5 mg/L monensin; LOV = 5 mg/L lovastatin.

²SEM = standard error of the mean.

and then chronologically. The year of publication follows the authors' names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors' names must appear in the reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). One-word titles are spelled out. Inclusive page numbers must be provided. Sample references are given below.

Journals

- Lane, M. A., R. L. Baldwin, and B. W. Jesse. 1995. Sheep rumen metabolic development in response to different dietary treatments. *J. Dairy Sci.* 78(Suppl. 1):310. (Abstr.)
- Tyrrell, H. F., and P. W. Moe. 1975. Effect of intake on digestive efficiency. *J. Dairy Sci.* 58:1151-1163.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.01.012

Books

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Vol. I (or Vol. II). 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

- Lengemann, F. W., R. A. Wentworth, and C. L. Comar. 1974. Physiological and biochemical aspects of the accumulation of contaminant radionuclides in milk. Pages 159-170 in *Lactation: A Comprehensive Treatise. Nutrition and Biochemistry of Milk/Maintenance*. Vol. 3. B. L. Larson and V. R. Smith, ed. Academic Press, London, UK.
- National Research Council. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

Conferences

- Barbano, D. M. 1996. Mozzarella cheese yield: Factors to consider. Page 29 in *Proc. Wisconsin Cheese Makers Mtg. Ctr. Dairy Res., Univ. Wisconsin, Madison*.
- National Mastitis Council. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of pre-milking and post-milking teat disinfections published since 1980. Pages 82-92 in *Natl. Mastitis Council. Reg. Mtg. Proc., Harrisburg, PA. Natl. Mastitis Council, Inc., Madison, WI*.

Other

- Biernoth, G., and W. Merk, inventors. 1985. Fractionation of milk fat using a liquified gas or a gas in the supercritical state. Unilever NV-PLC, assignee. US Pat. No. 4,504,503.
- FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. 3rd ed. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL.
- Interbull. 2005. Genetic evaluation. Direct longevity. <http://www.interbull.slu.se/longevity/framesida-long.htm> Accessed Dec. 20, 2005.
- Kelly, M. G. 1977. Genetic parameters of growth in purebred and crossbred dairy cattle. MS Thesis. North Carolina State Univ., Raleigh.
- Department of Agriculture, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collection at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. Fed. Regist. 69:10137-10151.

Tables

The use of tables should be minimized. When used, tables should be self-explanatory and may be the most effective way to organize extensive data. Refer to *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* for more information on effective use of tables. Table 1 may be used as an example.

Tables must be prepared using the table feature in Microsoft Word; tables prepared in other programs (e.g., Excel) or by using spaces, tabs, and hard returns will not convert accurately and errors can result. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns will create layout problems).

Place table number and title on the same line above the table (as shown in sample table). The table title does not require an ending period.

Do not use vertical lines and use few horizontal lines. Bold and italic typefaces should not be used in tables. When it is necessary to do so, such use must be defined in a footnote. Limit the data field to the minimum needed for meaningful comparison within the accuracy of the methods.

For each table, spell out the first use of abbreviations in parentheses or in numbered footnotes. Abbreviations should conform to journal style and be consistent with those used in the text. Avoid reference to other tables, figures, or text.

Footnotes to tables should be numerals. Each footnote should begin a new line (see sample table). For differences among means within a row or column, superscript letters should be used as appropriate sequentially (e.g., a, ab, b, c, cd) consistently from largest to smallest means. Probability may be indicated: † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figures

To facilitate review, figures should be placed at the end of the manuscript (separated by section breaks). Each figure should be placed on a separate page, and identified by the last name of the first author and figure number. Figure captions should be typed (double spaced) on a separate page. Current detailed information (summarized below) on figure preparation can be found at <http://jds.fass.org/misc/ifora.shtml>

- **Figure size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be prepared to fit one column (8.9 cm wide), 2 columns (14 cm wide), or full-page width (19 cm wide).

- **Font size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A

minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.

- **Fonts.** Use Helvetica, Times New Roman, Arial, and the symbols palette within those fonts only.

- **Line weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines. Avoid the use of gray or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.

- **Axis labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.

- **Shading and fill patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed; e.g., black, white, gray, diagonal stripes. Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print. Remove unnecessary backgrounds and gridlines from graphs.

- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, △, ▽, ★, ☆, ◇, ◆, +, or ×. Symbols should be defined in the figure caption or in a key on the figure (but not both).

- **File formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG formats.

- **Grayscale figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.

- **Color figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).

- **Resolution.** Minimum resolution is 300 dpi for grayscale and color figures, and 600 dpi for line art.

- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

- **Captions.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood without excessive reference to the text. All author-derived abbreviations and symbols used in the figure should be defined in the caption.

- **General tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.

- **Color Charge.** The use of color in figures should be avoided unless it is essential to understanding the

figure. The cost to publish each color figure is \$995; a surcharge for offprints will also be assessed. Authors must indicate in writing that they are willing to pay the additional cost of color reproduction; complete the Color Charge Agreement (<http://www.journalofdairy science.org>) and fax to JDS Headquarters. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.

Online-Only Data Supplements. Authors are now able to present material online that cannot physically be displayed in the print journal (e.g., Excel files, video), or that might be cost-prohibitive (e.g., extra tables or large data sets), or that is too detailed for publication in the print issue. A note will appear in the print version that more material can be found online. A small charge may be levied for preparing data supplements; contact journal headquarters (journals@assochoq.org) for more information. Material posted online only must go through the review process, and consequently should be in an application or format easily accessible by most reviewers and readers.

Statistical Analysis

Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. For group-fed animals, the group of animals in the pen or the paddock is the experimental unit; therefore, groups must be replicated. Repeated chemical analyses of the same sample usually do not constitute independent experimental units. Measurements on the same experimental unit over time also are not independent and must not be considered as independent experimental units. For analysis of time effects, use time-sequence analysis.

Usual assumptions are that errors in the statistical models are normally and independently distributed with constant variance. Most standard methods are

robust to deviations from these assumptions, but occasionally data transformations or other techniques are helpful. Most statistical procedures are based on the assumption that experimental units have been assigned to treatments at random. If animals are stratified by ancestry or weight or if some other initial measurement should be accounted for, the model should include a blocking factor, or the initial measurement should be included as a covariate.

A parameter [mean (μ), variance (σ^2)], which defines or describes a population, is estimated by a statistic (\bar{x} , s^2). The term *parameter* is not appropriate to describe a variable, observation, trait, characteristic, or measurement taken in an experiment.

Standard designs are adequately described by name and size (e.g., "a randomized complete block design with 6 treatments in 5 blocks"). For a factorial set of treatments, an adequate description might be as follows: "Tryptophan at 0.05 or 0.10% of the diet and niacin at 5, 10, or 20 mg/kg of diet were used in a 2×3 factorial arrangement in 5 randomized complete blocks, each block consisting of littermates." Note that a factorial arrangement is not a design; the term "design" refers to the method of grouping experimental units into homogeneous groups or blocks (i.e., the way in which the randomization is restricted).

Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that differences are not "statistically significant" is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by " \pm " to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only 1) the number of observations, 2) arithmetic treatment means, and 3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

For more complex experiments, tables of subclass means and tables of analyses of variance or covariance

may be included. When the analysis of variance contains several error terms, such as in split-plot and repeated measures designs, the text should indicate clearly which mean square was used for the denominator of each F statistic. Unbalanced factorial data can present special problems. Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases.

Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni t statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged. Fixed-range, pairwise, multiple comparison tests should be used only to compare means of treatments that are unstructured or not related. Adjusted, or so-called least squares, means should not be used unless the design is unbalanced or contains missing values or an adjustment is being made for a covariate. In factorial treatment arrangements, means for main effects should be presented when important interactions are not present. Means for individual treatment combinations also should be provided in table or text so that future researchers may combine data from several experiments to detect important interactions. An interaction may not be detected in a given experiment because of a limitation in the number of observations.

The terms *significant* and *highly significant* traditionally have been reserved for $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; however, reporting the P -value is preferred to the use of these terms. For example, use "... there was a difference ($P < 0.05$) between control and treated samples" rather than "... there was a significant ($P < 0.05$) difference between control and treated samples." When available, the observed significance level (e.g., $P = 0.027$) should be presented rather than merely $P < 0.05$ or $P < 0.01$, thereby allowing the reader to decide what to reject. Other probability (alpha) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report P -values to more than 3 places after the decimal. Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis should be based on the relative consequences of Type I and II errors. A "nonsignificant" relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship. An inadequate number of experimental units or insufficient control of variation limits the power to detect relationships. Avoid the ambiguous use of $P > 0.05$ to declare nonsignificance, such as indicating that a difference is not significant at $P > 0.05$ and subsequently declaring another difference significant (or a tendency) at $P < 0.09$. In addition, read-

ers may incorrectly interpret the use of $P > 0.05$ as the probability of a beta error, not an alpha error.

Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. In most cases, 2 or 3 significant digits (not decimal places) are sufficient.

Sensory Data

Sensory data should comply with the "Statement of Policy in the Report of the Committee on Sensory Data to the Journal Management Committee of the American Dairy Science Association, 1986," *Journal of Dairy Science* 69:298.

Computer Software

Computer software should conform to the "Report of ADSA Subcommittee on Standards for Publications with Reference to Computer Software," *Journal of Dairy Science* 70:209–210.

Nomenclature

Microorganisms. All microorganisms must be named by genus and species. The name of the genus must appear in full the first time that the microorganism is cited in the abstract, in the body of the paper, and in each table and figure legend. Thereafter, the genus can be abbreviated by its first initial unless it will be confused with other microorganisms cited in the paper, in which case each genus should be abbreviated to use enough letters to avoid confusion (e.g., *Strep.* vs. *Staph.*). The names of all microorganisms should be in italics. Specific strain designations and numbers should be used when appropriate. Authorities are not required.

For microorganisms that are genetic variants of a parent strain, the genotypic and phenotypic properties should be cited according to the procedures described by Demerec et al. (1966) in *Genetics* 54:61–76. Phenotypes should be identified by 3 letters; the first is capitalized. Genotypes should be identified by 3 lower-case italic letters. Superscript plus (+) signs are used to refer to a wild-type. The serial isolation number is placed after the locus symbol for mutations. The delta symbol is used to indicate deletions. Nomenclature for bacterial plasmids should be cited according to Novick et al. (1976) in *Bacteriological Reviews* 40:168–189.

Enzymes. Mention of an enzyme should include the EC number.

***In Vitro* Antimicrobial Susceptibility Tests**

Please refer to the JDS policy in Appendix 4 of this document.

Miscellaneous Usage Notes

Abbreviations. Abbreviations should not be used in the title, key words, or to begin sentences, except when they are widely known throughout science (e.g., DNA, RNA) or are terms better known by their abbreviation (e.g., IgG, CD). Abbreviations may be used in heads within the paper if they have been first defined within the text. The inside back cover of every issue of the journal lists abbreviations that can be used without definition. The list is subject to revision at any time, so authors should always consult the most recent issue of the journal (or the updated list at <http://www.journalofdairyscience.org>) for relevant information. Abbreviations are allowed when they help the flow of the manuscript; however, excessive use of abbreviations can confuse the reader. The suitability of abbreviations will be evaluated by the reviewers and editors during the review process and by the technical editor during editing. As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used less than 3 times after first use must be spelled out in full rather than abbreviated. Do not use abbreviations that replace single words, or single-letter abbreviations that could be confused with chemical elements (e.g., P, C, S). All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter, rather than the full term.

The abstract, text, each table, and each figure must be understood independently of each other. Therefore, abbreviations shall be defined within each of these units of the manuscript.

Plural abbreviations do not require "s." Chemical symbols and 1-letter and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Units of measure, except those in the standard JDS abbreviation list, should be abbreviated as listed in the *CRC Handbook for Chemistry and Physics* (CRC Press, 2000 Corporate Blvd., Boca Raton, FL 33431) and do not need to be defined.

International Words and Phrases. Non-English words in common usage (defined in recent editions of standard dictionaries) will not appear in italics (e.g., *in vitro*, *in vivo*, *ad libitum*, *in situ*, *a priori*). However, genus and species of plants, animals, or bacteria and viruses should be italicized. Authors must indicate

accent marks and other diacriticals on international names and institutions. German nouns shall begin with capital letters.

Capitalization. Breed and variety names are to be capitalized (e.g., Holstein, Danish Red). Trademarked or registered names should be capitalized, but no TM or ® symbols should be used. Proper nouns should be capitalized.

Numbers and Units. The *Journal of Dairy Science* uses the Council of Science Editors' number style given in the seventh edition of *Scientific Style and Format*.

Numbers less than 1 shall be written with preceding zeros (e.g., 0.75). All numbers shall be written as digits; a comma separator must be used in numbers greater than 999. Measures must be in the metric (SI) system; however, US equivalents may be given in parentheses. Units of measure not preceded by numbers must be written out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically. Measures of variation must be defined in the Abstract and in the body of the paper at first use.

General Usage. Note that "and/or" is not permitted; choose the more appropriate meaning or use "x or y or both."

Use the slant line only when it means "per" with numbered units of measure or "divided by" in equations. Use only one slant line in a given expression: e.g., g/d per cow. The slant line may not be used to indicate ratios or mixtures.

Use "to" instead of a hyphen to indicate a range of values.

Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation (=, −, +, ×, >, or <) when these signs occur between 2 items.

Items in a series should be separated by commas: e.g., a, b, and c.

Restrict the use of "while" and "since" to meanings related to time. Appropriate substitutes include "and," "but," or "whereas" for "while" and "because" or "although" for "since."

Commercial Products. The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is being tested as part of the experiment, the manufacturer and location (or web site address) should be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures, but, when possible, the generic name should be used thereafter. Trademark symbols and registration marks should not be used and will be removed.

Avoid describing a method as "per manufacturer's instructions." If the product goes out of production, the method will be lost to readers. Many products come

with literature references; try to use references that can be found by other researchers to describe a method being used.

Supplemental Information

The following information is available online and updated regularly. Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles and words used in citations is available in Appendix 3.

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>

Figure and Table Preparation Guidelines. Current information on figure and table preparation can be found at <http://www.journalofdairyscience.org/>

Manuscript Central Instructions. Manuscripts are submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>. Full user instructions for using the Manuscript Central system are available at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds/index.html?mode=instruction>.

ARTIGO 4

**PERFIL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA INFECÇÃO
INTRAMAMÁRIA EM BÚFALAS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL¹**

PERFIL DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA EM BÚFALAS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL¹

Elizabeth S. Medeiros², Severino Benone Paes Barbosa³, Raquel Bezerra Jatobá³, Sérgio Santos Azevedo⁴, José Wilton Pinheiro Junior⁵, Tomoe Noda Saukas², Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque², Rinaldo Aparecido Mota^{2*}

ABSTRACT.- Medeiros, E. S.², Barbosa, S. B. P.³, Jatobá R. B.³, Azevedo S. S.⁴, Pinheiro Junior J. W.⁵, Saukas T. N.⁶, Pedro Paulo Albuquerque⁷, Mota R. A.⁷ **Somatic cell count profile in the intramammary infection in buffaloes from the Brazilian Northeastern Region** departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 51171-900, Brazil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com The aim of this study was to evaluate the somatic cell profile in the subclinical mastitis in dairy buffaloes in the Brazilian Northeastern. One thousand eight hundred ninety six milk samples from 474 buffaloes proceeding from four dairy farms located in the states of Pernambuco, Alagoas, Bahia and Ceará were analyzed. The lactic secretion was submitted to the Califórnia Mastitis Test (CMT) and the positive samples, from two crosses on were collected for the Somatic Cell Count (SCC) and microbiologic exam. It was observed that the positive samples at the microbiologic exam presented SCC between 280,000 and 401,000 cells/mL with median of 328,000 cells/mL. It was concluded that SCC values above 280,000 cells/mL is an indication of mammary gland infection, however, the microbiologic exam of the milk is the best method for the diagnostic of subclinical mastitis in buffaloes. The observation of *Staphylococcus* coagulase-negative exerting influence in the SCC elevation must be subject of further studies in order to elucidate the pathogenicity of this group of microorganisms in the inflammatory processes of buffaloes mammary gland

INDEX TERMS: milk, buffaloes, microbiology, SCC

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado em Biociência Animal do primeiro autor.

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 51171-900 *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com

³ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 51171-900

⁴ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil

RESUMO.– Objetivou-se com esse estudo avaliar o perfil de células somáticas na mastite subclínica em búfalas leiteiras no Nordeste do Brasil. Foram analisadas 1896 amostras de leite de 474 búfalas procedentes de quatro propriedades de exploração leiteira nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia e Ceará. A secreção láctea de cada teto foi submetida ao Califórnia Mastitis Test (CMT) e as amostras positivas, a partir de duas cruzes foram coletadas para realização da Contagem de Células Somáticas (CCS) e exame microbiológico. 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 280.000 cel/mL é um indicativo de infecção da glândula mamária, contudo o exame microbiológico do leite é o melhor método para diagnóstico da mastite subclínica em búfalas. A observação dos *Staphylococcus* coagulase negativa exercendo influência na elevação da CCS deve ser objeto de outros estudos para elucidar a patogenicidade desse grupo de microrganismos nos processo inflamatório da glândula mamária de búfalas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: leite, diagnóstico, mastite, microbiologia, CCS

INTRODUÇÃO

As células somáticas são representadas pelos leucócitos e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna do teto e são eliminadas no leite durante o curso normal da lactação (GALIERO e MORENA, 2000). A inflamação da glândula mamária resultante da introdução e multiplicação de microrganismos patogênicos conduz a uma série complexa de eventos que reduz a atividade sintética da glândula, provoca mudanças na composição do leite e eleva a contagem de células somáticas (CCS). A CCS, sendo uma expressão direta da severidade do processo inflamatório, é o parâmetro usualmente utilizado para avaliar a

saúde do úbere em relação à qualidade e higiene do leite e monitoramento em programas de controle de mastites (HARMON, 1994).

Ao considerar leite de conjunto, em 1994, a legislação da Comunidade Européia determinou que o leite de origem bovina, caprina, ovina ou bubalina, quando destinado ao consumo humano deve apresentar, entre outras características, uma contagem máxima de células somáticas de 400.000 células/mL (BIERENS, 1993).

Para búfalas, no Brasil, ainda não existe uma legislação que regule 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 et al., 2005; ARAÚJO e GHELLER, 2005).

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

Búfalas com elevada CCS apresentam redução da produção de leite (PETROVA e TZANKOVA, 1999; CERON- MUÑOZ et al., 2002b; TRIPALDI et al., 2003), alterações dos teores de seus constituintes (PETROVA e TZANKOVA, 1999; TRIPALDI et al., 2003) e alterações no tempo de coagulação do leite no processo de fabricação de queijos, comprometendo a qualidade, processamento e rendimento industrial (TRIPALDI et al., 2003). Ainda nessa espécie, os altos valores para a CCS influenciam negativamente a produção de leite, acarretando prejuízos ao produtor, devido à diminuição da produção e qualidade do leite (TONHATI et al, 2001).

Considerando o reduzido número de trabalhos envolvendo a qualidade do leite de búfalas no Brasil, objetivou-se com esse estudo avaliar o perfil de células somáticas e a mastite subclínica em búfalas no Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 1896 amostras de leite de 474 búfalas procedentes de quatro propriedades de exploração leiteira situadas nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia e Ceará. Os rebanhos eram constituídos de animais de diferentes idades, da raça Murrah e seus mestiços e encontravam-se em diferentes estágios de lactação. Eram

criados em sistema intensivo ou semi-intensivo e submetidos à ordenha mecânica canalizada ou balde ao pé.

A secreção láctea de cada teto foi submetida ao Califórnia Mastitis Test (CMT) (SCHALM e NOORLANDER, 1957). As amostras positivas ao CMT, a partir de duas cruzes (641 amostras) foram coletadas para a avaliação da CCS e realização do exame microbiológico.

Para avaliação da CCS, as amostras foram acondicionadas em frascos apropriados contendo o conservante Bronopol®, sendo imediatamente refrigeradas e encaminhadas ao laboratório. A contagem de células somáticas foi realizada no Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do leite na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, por meio de equipamento eletrônico SomaCount 300 pelo método de citometria de fluxo (MILK, 1995).

As amostras de leite para as análises microbiológicas foram obtidas após prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio do teto com álcool a 70°GL. Coletaram-se aproximadamente cinco mL de leite em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, sendo enviadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para processamento no laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos da UFRPE.

Alíquotas de 10µL de leite foram semeadas em placas de ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e posteriormente foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, realizando-se leituras após 24, 48h e 72 h. Posteriormente foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise. Ao microscópio foram observadas a disposição das células e as características morfotintórias à técnica do Gram (CARTER, 1991).

A classificação das bactérias Gram positivas foi realizada de acordo com Quinn et al. (1994). Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram realizadas provas bioquímicas como produção de coagulase livre, DNase e catalase, segundo Silva et al. (1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980). Os isolados foram classificados em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), quando positivo em todos os testes, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), quando positivo para a produção da coagulase, fermentação da glicose em anaerobiose e catalase, mas negativo em algum dos outros testes. Em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN)

quando a bactéria não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase (BAIRD-PARKER, 1990).

Para a identificação das enterobactérias foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de urease, reação em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), teste de VM/VP (VM - reação de Vermelho de Metila; VP - reação de Voges-Proskauer), teste em Ágar SIM (S - produção de H₂S; I - produção de Indol; M - motilidade) e teste em Ágar Citrato (utilização do carbono do citrato), sendo identificadas de acordo com Carter (1991).

Para a avaliação da CCS frente ao cultivo microbiológico (padrão ouro), foram calculados sensibilidade, especificidade e indicador de concordância Kappa (PEREIRA, 1995). O teste de hipóteses foi efetuado com o teste de McNemar, com nível de significância de 5% (SIEGEL e CASTELLAN Jr., 2006). As análises foram efetuadas com o programa DagStat (MACKINNON, 2000).

Na comparação da contagem de células somáticas entre amostras positivas e negativas no cultivo microbiológico, foi utilizada a mediana como medida de tendência central, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. A comparação entre os dois grupos (positivas e negativas no cultivo) foi realizada com o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Para as comparações das proporções de agentes isolados no cultivo microbiológico de acordo com o resultado na CCS foi utilizado o teste de qui-quadrado (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram feitas com o programa SPSS for Windows versão 13.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados da média da CCS em relação ao exame microbiológico. Quando se considerou a média de CCS (400.000 cel/mL) estabelecida por Piccinini et al. (2006) como ponto de corte para o leite de búfala, observou-se que 220 (54,9%) amostras negativas e 181 (45,1%) positivas ao exame microbiológico apresentaram média de CCS \leq 400.000 cel/mL, respectivamente. Quando a média de CCS foi $>$ 400.000 cel/mL, observou-se que 146 (60,8%) amostras foram positivas e 94 (39,2%) negativas no exame microbiológico.

Ao analisar a concordância entre os testes de CCS e exame microbiológico, considerando esse último como o padrão ouro verificou-se uma fraca concordância (K = 0,146), sensibilidade de 44,7% e especificidade de 70,1% (Tabela 1).

Considerando os resultados obtidos nesse estudo, 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, independente do microrganismo isolado. As amostras negativas no exame microbiológico apresentaram CCS entre 164.000 a 232.000 cel/mL com mediana de 197.000 cel/mL. Observou-se diferença significativa entre a CCS entre os dois grupos ($p=0,0001$) (Tabela 2).

Os resultados médios obtidos nesse estudo para considerar as amostras positivas em ambos os testes estão próximos daqueles relatados na literatura internacional e podem ser úteis ao proprietário que utiliza a CCS para avaliar a sanidade da glândula mamária dos animais dos rebanhos na região estudada. Ao verificar valores entre 280.000 até 401.000 cel/mL pode-se suspeitar que a amostra seja positiva e solicitar exame microbiológico para confirmar o agente infeccioso envolvido na infecção intramamária para implantar medidas de profilaxia e controle. Sabe-se que existem outros fatores não infecciosos que também podem elevar a CCS no leite das búfalas como o início e final da ordenha (DHAKAL et al., 1991; BASTOS, 2005), estação do ano (SINGH e LUDRI, 2001).

Carvalho et al. (2007) relataram que o padrão de contagem de CCS para bubalinos é diferente do normalmente encontrado para bovinos e que os baixos valores de CCS não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária. Esse achado também foi observado no presente estudo, pois algumas amostras com CCS abaixo do limite inferior de 280.000 cel/ml foram positivas no exame microbiológico. Em outros casos também se observaram amostras de leite com alta CCS e exame microbiológico negativo. Sobre esse aspecto Dhakal et al. (1992) chamaram de processos inflamatórios inespecíficos aqueles que contavam com mais de 500.000 células/mL acompanhados de exame microbiológico negativo em amostras de leite de búfalas. Esses resultados demonstram que o exame microbiológico é mais sensível que a CCS na detecção da infecção esse último deve ser utilizado como teste de triagem das amostras. Na impossibilidade de relacionar a CCS com o exame microbiológico alguns autores adotaram o valor de 500.000 células/mL para selecionar os quartos com presença ou ausência do quadro subclínico (SINGH et al., 2002; SINGH et al., 2004; VIVEK et al., 2002; DHAKAL, 2004).

São poucos os trabalhos de CCS em leite de búfalas realizados no Brasil, e na região Nordeste quase nada se sabe sobre esse parâmetro de avaliação da sanidade da glândula mamária. Muitas vezes se utiliza os parâmetros de CCS para bovinos que

podem não ser adequados para monitoramento de mastite em rebanhos bubalinos. Sabe-se que os bubalinos são mais resistentes às infecções intramamárias que os bovinos e apresentam diferenças quantitativas e qualitativas na celularidade do leite (SILVA e SILVA, 1994). Ainda de acordo com Lau (1994), as búfalas apresentam tetos mais pendulosos, contudo o ductus papilaris é mais musculoso com maior quantidade de fibras e vasos sanguíneos, funcionando como barreira eficiente contra as infecções. Contudo nesse estudo observou-se que a frequência de casos de infecção no exame microbiológico foi elevada correspondendo a 51% (327/641) das amostras com CMT a partir de 2+. Esses resultados também demonstraram que o CMT não foi eficiente para identificar os verdadeiros positivos no exame microbiológico. Embora alguns autores acreditem que o CMT possa ser empregado como método indireto de auxílio no diagnóstico de mastite subclínica em búfalas, Pardo (2007) observaram que existem sérias restrições quanto a essa idéia em função das baixas contagens celulares, tanto na presença quanto na ausência de bactérias nos quartos mamários. Concluíram também que o exame microbiológico se apresentou como a referência mais segura na identificação de quartos acometidos por mastite subclínica envolvendo microrganismos.

Os resultados do presente estudo corroboram parcialmente com os de Moroni et al. (2006) que analisaram microbiologicamente amostras de leite bubalino com CCS acima de 200.000 cel/mL e observaram a presença de infecção intramamária em 100% dos quartos, enquanto que 98% das amostras que apresentaram contagem inferior a este valor foram negativas no exame microbiológico. De acordo com esses autores, esse valor de CCS apresenta uma sensibilidade de 99,1% especificidade de 100% na identificação de quartos com e sem infecção, respectivamente. Apesar do limite de CCS semelhante em ambos os estudos para considerar as amostras positivas no exame microbiológico, no presente estudo a sensibilidade e especificidade foram inferiores àquelas relatadas por esse autor. Ainda quando se considerou a CCS acima de 280.000 cel/mL para efeito de cálculo da sensibilidade e especificidade não se observou grande variação nesses valores (Sens = 55,8% e Espec = 62,5%).

Cerón-Muñoz et al. (2002) adotaram a CCS acima de 283.000 células/mL como ponto de corte para considerar a presença de mastite subclínica em búfalas, dados que também se aproximam dos obtidos nesse estudo.

Por outro lado, os resultados do presente estudo discordam dos índices de CCS observados por Carvalho et al. (2007) que estudaram a CCS e o isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas em oito rebanhos na região do Alto do São Francisco,

MG e observaram que as amostras de leite com CCS variando de 12.840 a 149.680 cel/mL apresentaram infecção por diversos patógenos. No presente estudo, a maioria das amostras que apresentaram CCS entre 164.000 a 232.000 cel/mL foram negativas no exame microbiológico.

Ainda ao se avaliar o valor mínimo para do intervalo de confiança (280.000 cel/mL) observou-se diferença se comparados aos trabalhos anteriormente realizados por Silva e Silva (1994) que consideraram a CCS no leite de búfalas normal entre 50.00 e 375.000 cel/mL, enquanto que Galiero e Morena (2000) relataram valores para a CCS no leite bubalino entre 50.000 e 100.000 cel/mL.

Na tabela 3 observou-se uma maior frequência de bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo 52 (21,8%) seguido do *Corynebacterium* spp. 40 (16,7%), bactérias Gram negativas (8,8%), *Staphylococcus* coagulase positiva (5,9%), *Staphylococcus aureus* (1,3%) nas amostras de leite com valores de CCS acima de 400.000 cel/mL.

Para bovinos, Zafalon et al. (1999) estudaram a influência do *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase positivos (SCP) e coagulase negativos (SCN) sobre a CCS de quartos mamários com mastite. Comparando os quartos afetados com os saudáveis, ressaltaram que alguns gêneros bacterianos exercem maior influência sobre a contagem de células somáticas. A maior variação foi determinada pelos SCN que provocaram uma variação de 862,7%, ou seja, uma elevação de 75.000 para 722.000 células/mL entre os quartos saudáveis e os afetados. Em seguida os *Staphylococcus* coagulase positivos, com elevação de 613,0% (de 92.000 para 656.000 células/mL) e os *Corynebacterium* spp que determinaram variação de 548,2% (de 137.000 para 888.000 células/mL).

Para búfalas, 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. Apesar de nesse estudo não se ter calculado a CCS por microrganismo isolado, a CCS de uma forma geral esteve mais elevada. No presente estudo essa análise não foi realizada, pois optou-se por avaliar a presença da infecção independente do microrganismo uma vez que essa é a realidade de campo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que valores de CCS acima de 280.000 cel/mL é um indicativo de infecção da glândula mamária, contudo o exame microbiológico do leite é o melhor método para

diagnóstico da mastite subclínica em búfalas. A observação dos *Staphylococcus* coagulase negativa exercendo influência na elevação da CCS deve ser objeto de outros estudos para elucidar a patogenicidade desse grupo de microrganismos nos processo inflamatório da glândula mamária de búfalas.

REFERÊNCIAS

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

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

BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **J. Appl. Bacteriol.**, Supp. v.19, p. 15-85, 1990.

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

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

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. Brucella. In: CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology.** 4ed. Philadelphia: London, 1991. p.196-201.

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*) **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.242-245, 2007

CERÓN-MUÑOZ M, TONHATI H, DUARTE JMC. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Rev Inst Lat Cândido Tostes**, v.57, n.324, 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. **J Dairy Sci**, v.85, p.2885-2889, 2002b.

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

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

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

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

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

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

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

MAC FADIN J 1980. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interesse clínico.** Buenos Aires. Panamericana.

MACKINNON A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Comput. Biol. Med.** 30(3):127-134, 2000.

MILK: enumeration of somatic cells. Bulletin of international dairy federation. N. 148A, 8p. 1995.

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

PARDO, R. B. **Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite** 2007 80f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Jaboticabal, São Paulo, 2007.

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

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 598 p.

QUINN P. J., CARTER M. E., MARKEY B. K. & CARTER G. R. Mastitis, p. 327- 44. In: **Clin. Vet. Microbiol.** Wolfe Publishing, London. 1994.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.** v. 130, n. 5, p.199-207, 1957.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997, pg.295

SIEGEL, S.; CASTELLAN Jr., N. J. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448p.

SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo J.**, v. 10, n. 2, p. 133-7, 1994.

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

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

SINGH M, LUDRI RS. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. **Asian-Austral J Anim Sci**, v.14, p.189-192, 2001.

TONHATI, H. **Produção e qualidade do leite e melhoramento genético de búfalos no Estado de São Paulo**, 2001. Tese de Livre Docência – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade estadual Paulista, Jaboticabal.

TRIPALDI, C.; TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, S.; ANGELUCCI, M.; DANESE, V. The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo milk. **Asian Australasian J. Anim. Scien.**, v. 16, n. 5, p. 738-42, 2003.

TUTEJA, F.C.; KAPUR, M.P.; SHARMA, A.; MANUJA, B. Mastitis pathogens from apparently healthy buffaloes and their relationship to somatic cell count of milk. **Indian J. Comp. Microb., Immun. Infec. Diseas.**, v. 22, n. 2, p. 162-3, 2001.

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

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

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

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663p.

Quadro 1. Resultado da média de CCS frente ao exame microbiológico em amostras de leite de búfalas em propriedades no Nordeste do Brasil.

CCS	Exame microbiológico				Total	
	Negativo		Positivo		N	%
	N	%	N	%		
≤ 400	220	54,9	181	45,1	401	100,0
> 400	94	39,2	146	60,8	240	100,0

Sensibilidade: 44,7% (IC 95% = 39,2% - 50,2%)

Especificidade: 70,1% (IC 95% = 64,7% - 75,1%)

Indicador *Kappa*: 0,146 (IC 95% = 0,072 - 0,220); concordância fraca

Teste de McNemar: $p < 0,0001$

Quadro 2. Mediana e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) da contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de búfalas em propriedades no Nordeste do Brasil, segundo o resultado do cultivo microbiológico.

Exame microbiológico	Número de amostras	Contagem de células somáticas		p*
		Mediana	IC 95% _{mediana}	
Positivo	327	328	280 - 401	0,0001
Negativo	314	197	164 - 232	

* Teste U de Mann-Whitney

Quadro 3. Frequência de microorganismos isolados em leite de búfalas segundo o resultado na contagem de células somáticas no Nordeste brasileiro

CCSx1000	Exame microbiológico													
	Sem isolamento		<i>Staphylococcus aureus</i>		SCP		SCN		<i>Corynebacterium</i>		Bactérias G-		Outros	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
≤ 400	220	54,9	2	0,5	16	4	69	17,2	37	9,2	34	8,5	23	5,7
> 400	94	39,3	3	1,3	14	5,9	52	21,8	40	16,7	21	8,8	15	6,3
Total	314	49,1	5	0,8	30	4,7	121	18,9	77	12	55	8,6	38	5,9

P = 0,005

REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através dos e-mails <jurgen@ufrj.br> ou pvb@pvb.com.br, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF anexo). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científicas, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br)**. O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e ano.)"**; a referência do trabalho que **serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), **os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações)**. Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. **Nesse caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomendo, se possível, com "a" em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

- Existe uma elevada frequência de mastite subclínica em rebanhos bubalinos no Nordeste do Brasil, destacando a participação de *Staphylococcus coagulase negativa*. Para reduzir sua frequência de casos nos rebanhos, é necessária a intensificação das boas práticas de obtenção do leite, higiene das instalações e capacitação de ordenhadores;
- *Staphylococcus* spp. isolados em casos de mastite bubalina na região nordeste do Brasil apresentam diferentes níveis de resistência a antimicrobianos, e dessa forma deve-se ter precauções quanto à escolha da terapia para obter maior sucesso no tratamento e minimizar os riscos à saúde do consumidor de leite;
- Os fatores de risco identificados nesse estudo devem ser cuidadosamente corrigidos para reduzir a frequência de casos de mastite e assim contribuir para o controle e prevenção da doença nos rebanhos estudados;
- Valores de CCS acima de 280.000 cel/mL são um indicativo de infecção da glândula mamária. Contudo, o exame microbiológico do leite é o melhor método para diagnóstico da mastite subclínica em búfalas. A observação dos *Staphylococcus coagulase negativa* exercendo influência na elevação da CCS deve ser objeto de outros estudos para elucidar a patogenicidade desse grupo de microrganismos nos processo inflamatório da glândula mamária de búfalas;
- O estudo da mastite bubalina com essa abrangência é pioneiro na região nordeste do Brasil. Os resultados aqui apresentados irão contribuir para o desenvolvimento da bubalinocultura de leite nessa região do país, principalmente no que se refere ao controle dessa doença.

ANEXOS**QUESTIONÁRIO****FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À MASTITE BUBALINA**

Nome da Propriedade: _____ Município: _____
 Proprietário: _____ Estado: _____
 Endereço: _____ Telefone: _____
 Email: _____ Data: ___ / ___ / _____
 Questionário nº _____ Investigador: _____

DADOS DO PROPRIETÁRIO

Idade do criador: _____ anos

Estado civil:

- 1- Solteiro ()
- 2- Casado ()
- 3- Separado ()
- 4- Viúvo ()
- 5- Concubinato ()

41- Já realizou algum curso ou treinamento em controle das mastites?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

42 - Esta é sua ocupação principal?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

Escolaridade

- 1- Analfabeto ()
- 2- Fundamental incompleto ()
- 3- Fundamental completo ()
- 4- Médio incompleto ()
- 5- Médio completo ()
- 6- Superior incompleto ()
- 7- Superior ()
- 8- Profissionalizante ()

43 -Tempo na atividade?

- 1- <1 ano ()
- 2- Entre 1 e 2 anos ()
- 3- Entre 2,1 e 3 anos ()
- 4- Entre 3,1 e 5 anos ()
- 5- Acima de 5 anos ()

40 -Pertence a algum tipo de cooperativa?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

DADOS DA PROPRIEDADE

Propriedade Informatizada:

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

2- Característica Racial:

- 1- Pura ()
- 2- Mestiça ()

1- Raça:

- 1- Murrah ()
- 2- Mediterrâneo ()
- 3- Jafarabadi ()
- 4- Carabao ()
- 5- Outras _____

3- Vacinação:

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

4- Vermifugação:

- 1- Sim ()

- 2- Não ()
- 5- Suplementa a alimentação:
1- Sim ()
2- Não ()
- 6- Mineralização:
1- Sim ()
2- Não ()
- 7- Sistema de Criação:
1- Intensivo ()
2- Extensivo ()
3- Semi-Intensivo ()
- 8- Fonte Hídrica:
1- Parada ()
2- Corrente ()
3- Parada + Corrente ()
- 9- Assistência Veterinária:
1- Não ()
2- Permanente ()
3- Temporária/Esporádica ()
- 10- Tipo de ordenha
1- Manual ()
2- Mecânica balde-ao-pé ()
3- Mecânica canalizada ()
- 11- Local de ordenha
- 1- Curral ()
2- Sala de ordenha ()
- 12- Búfalas em lactação (%)
1- Menos de 30 ()
2- Entre 31 e 60 ()
3- Acima de 60 ()
- 13- Búfalas até a 3ª lactação (%)
1- 0 a 59 ()
2- Entre 60 e 79 ()
3- Entre 80 e 100 ()
- 14- Produção leite/dia (litros)
1- Menos de 300 ()
2- De 301 a 500 ()
3- Acima de 500 ()
- 15- Realiza controle de moscas
1- Sim ()
2- Não ()
- 16- Realiza limpeza das instalações
1- Sim ()
Semanalmente ()
De 15 em 15 dias ()
Mensalmente ()
2- Não ()

MANEJO DA ORDENHA

- 17- Linha de ordenha
1- Sim ()
2- Não ()
- 18- Teste da caneca telada
1- Sim ()
2- Não ()
- 19- Presença de bufalinho ao pé
1- Sim ()
2- Não ()
- 20- Lavagem dos tetos antes da ordenha
1- Sim ()
2- Não ()
- 21- Secagem dos tetos após a lavagem
1- Sim ()
2- Não ()
- 22- Processo de secagem dos tetos após a lavagem
1- Papel comum ()
2- Papel toalha ()
3- toalha de pano ()

- 23- Anti-sepsia dos tetos antes da ordenha
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 24- Anti-sepsia dos tetos após da ordenha
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 25- Realiza rodízio de desinfetante
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 26- Alimentação durante a ordenha
 1- Sim ()
- 30- Realiza rodízio de antimicrobianos
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 27- Imersão das teteiras entre as ordenhas de animais (ordenha mecânica)
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 28- Terapia da vaca seca
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 29- Tratamento de mastite clínica
 1- Sim ()
 2- Não ()

HIGIENIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS DE ORDENHA

- 31- Tempo de uso do equipamento de ordenha
 1- Até 4 ()
 2- Entre 5 e 10 ()
 3- Superior a 10 ()
- 32- Manutenção do equipamento de ordenha
 1- Semestral ()
 2- Esporádico ()
 3- Não realizada ()
- 33- Disponibilidade de água quente
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 34- Uso de detergente alcalino
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 35- Uso de detergente ácido
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 36- Uso de sanitizante
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 37- Limpeza do equipamento de ordenha
 1- Automático ()
 2- Manual ()
- 38- Treinamento dos ordenhadores
 1- Sim ()
 2- Não ()
- 39- Hábitos higiênicos dos ordenhadores
 1- Adequado ()
 2- Inadequado ()

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)