

Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco.

Isolation of bacterial agents associated with subclinical mastitis in bovine in the State of Pernambuco

RESUMO: Foram examinadas 43 vacas em lactação totalizando 104 quartos mamários os quais foram positivos ao California Mastitis Test (CMT). Antes da ordenha realizava-se a antisepsia dos quartos mamários e em seguida colhia-se amostras de cinco mL de leite; estas eram homogeneizadas e uma alíquota de 0,01 mL era semeada na superfície de ágar sangue bovino a 5% e incubados em estufa bacteriológica a 37° C, sendo as leituras efetuadas após 24 e 48 horas de incubação. *Staphylococcus sp.* foi o agente mais freqüente neste tipo de mastite e na região estudada.

PALAVRAS CHAVE: Mastite subclínica, Bovinos, *Staphylococcus sp.*

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 2(2):31-36, 2001.
Publicação Online da EMV - UFBA

INTRODUÇÃO

A mastite se constitui num processo inflamatório da glândula mamária, de evolução aguda a crônica. Pode se apresentar nas formas clínica ou subclínica, conforme se evidencie ou não sinais de inflamação (CENTORBI et al. 1992). A forma subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica, pois pode grassar silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção (BLOOD & RADOSTITIS 1991).

Segundo SEARS et al. (1993), os principais microrganismos causadores de mastite bovina podem ser divididos em cinco grupos: cocos Gram-positivos, bactérias Gram-negativas, corinebactérias e *Actinomyces*, *Mycoplasma* e outros como *Nocardia ssp.*, *Prototheca ssp.* e leveduras; entretanto os cocos Gram-positivos constituem o principal grupo, responsáveis por mais de 90% das ocorrências (BIER 1990; SILVA 1993), sendo o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* as espécies mais freqüentes (LANGENEGGER et al. 1986; RIEDNER et al. 1987; CARTER 1988; SISCHO et al. 1993). Segundo FERREIRO et al. (1981) e RIEDNER et al. (1987), o *Staphylococcus aureus* ocupa o primeiro lugar

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMMARY: In this study were investigated 43 milking cows including 104 quarters of the udder that were positive for California Mastitis Teste (CMT). For that purpose the antiseptics before the milking was performed in the quarters and five ml of milk were collected aseptically and homogenized. Samples of 10 ml were inoculated at surface of Bovine Blood Agar and incubated at 37°C for 24-48 h. Isolates were identified by Standart Bacteriological Techniques. The results showed that *Staphylococcus sp.* were the microorganism most frequently isolated.

KEYWORDS: Subclinical mastitis, Bovine, *Staphylococcus sp.*

na freqüência de isolamentos, ficando o *Streptococcus sp.* em posição secundária, certamente devido à suscetibilidade que apresentam aos antibióticos.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae; são cocos Gram-positivos, imóveis, arrumados em massas irregulares ou em cachos de uva, anaeróbios facultativos ou aeróbios, catalase positivos e apresentam diversas espécies (CARTER 1988; BIER 1990). Dentre as espécies que são positivas ao teste da coagulase o *Staphylococcus aureus* é a principal (BOUCHOT et al. 1985; WATTS 1988; FERNANDES 1992). FOX & GAY (1993), estimaram que cerca de 19 a 40,7% das vacas são infectadas por este microrganismo.

As mastites por *Staphylococcus* coagulase negativa são causadas por *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* encontrados com alta freqüência em amostras de leite. A prevalência de *S. epidermidis* é de 11,3 a 23,19% (NADER FILHO et al. 1985; LANGONI et al. 1991).

ALMEIDA et al. (1996), observaram que o *Staphylococcus aureus* é capaz de invadir e se

replicar dentro das células epiteliais da glândula mamária bovina, podendo esse mecanismo ser um pré-requisito para a infecção, além de levar a resultados falso negativos nos exames bacteriológicos e influenciar na eficácia dos antibióticos usados no tratamento das mastites causadas por esse microrganismo.

Os estreptococos pertencem à família *Streptococaceae*, gênero *Streptococcus* e são cocos Gram-positivos, geralmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase negativos (BIER 1990). Três espécies são mais frequentemente identificadas como causadoras de mastite, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*, sendo o *Streptococcus agalactiae* o mais prevalente (SCHALM et al. 1971; WATTS 1988; FERNANDES 1992).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito através da sintomatologia, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras secreções patológicas. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite. Além disso, existe a necessidade da cultura e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados (BOUCHOT et al. 1985).

O California Mastitis Test (CMT) desenvolvido por Schalm, Noorlander em 1957, constitui-se num método indireto de avaliação da quantidade de células somáticas do leite, o qual baseia-se na atuação de um detergente aniônico sobre a membrana celular, causando a ruptura da mesma e a formação de um gel na interação dos ácidos nucléicos com o detergente (ROSENBERGER 1983).

Segundo FAGLIARI et al. (1983), o CMT constitui-se numa prova de triagem para detecção de mastite subclínica de fácil execução, sendo indicado para monitorar rebanhos a campo onde observaram que amostras reagentes ao CMT nos graus 1+, 2+ e

3+ concordaram com o exame bacteriológico em 22,4%, 74,4% e 85,6% respectivamente.

LONGO et al. (1994), estudando a mastite subclínica em quatro rebanhos, compostos por 118 vacas leiteiras e 468 quartos mamários, verificaram que o *Staphylococcus aureus*, foi isolado de 44,7% dos casos, *Staphylococcus coagulase negativa* de 31,6% e *Streptococcus sp* de 11,4%, sendo o *Staphylococcus aureus* o agente etiológico mais freqüente nas mastites subclínicas.

HARROP et al. (1975), estudando a incidência da mastite bovina em 866 vacas procedentes do Agreste Meridional de Pernambuco encontraram 338 vacas reagentes ao CMT (39,0%) e 275 animais (31,2%) estavam com infecções no úbere detectadas pelo exame bacteriológico, sendo, *S. aureus* e *Streptococcus sp.* as bactérias mais freqüentes. Na região de Ribeirão Preto, São Paulo, NADER FILHO et al. (1985), verificando a prevalência da mastite bovina encontraram 11,9% das vacas reagentes ao CMT e 11,1% foram confirmadas através do isolamento do agente etiológico, dentre os quais o *Staphylococcus aureus* foi isolado de 52,1% dos casos, *S. epidermidis* de 11,3% e *Streptococcus spp* de 26,8 e outros agentes de 9,8.

No município de Itaguaí, Rio de Janeiro, 198 vacas mestiças, com úbere aparentemente sadio foram submetidas ao CMT. Dessas, 80 (40,4%) apresentaram reação ao teste, sendo então colhidas 180 amostras de leite das quais o *Staphylococcus aureus* foi isolado em 52,2% e *Staphylococcus coagulase negativa* em 16,6% (VIANNI et al. 1992).

Através do estudo etiológico da mastite clínica em bovinos, COSTA et al. (1995), examinaram 3.574 vacas em diferentes estágios de lactação, e verificaram que do total de amostras analisadas, 22,23% foram negativas no exame microbiológico, e nas amostras positivas (77,77%) observaram que os principais agentes isolados foram *Staphylococcus sp.* (34,09%),

Streptococcus sp. (28,05%) e *Corynebacterium sp.* (21,77%).

COSTA et al. (1985), considera o *Corynebacterium bovis* o menor patógeno, de importância secundária na etiologia da mastite bovina, ou para alguns, comensal do úbere dos bovinos. Apresenta-se como um dos mais prevalente microrganismo isolado em levantamentos realizados em diferentes países. É isolado em menos de 1% dos quartos nos rebanhos que adotam “pré e pós dipping” (BLOOD & RADOSTITIS 1991).

Os *Bacillus sp* são saprófitas e patógenos oportunistas. Os casos de mastites por *B. cereus*, freqüentemente estão associados a contaminação cirúrgica ou lesões nos tetos. BLOOD & RADOSTITIS (1991); JONES & TURNBULL (1981), reportaram em quatro propriedades rurais 280 casos, sendo cinco fatais.

O controle da mastite nos rebanhos leiteiros constitui um importante passo para a elaboração de produtos de boa qualidade e diminuição dos riscos à população, diante disso, este estudo teve como objetivo isolar e identificar os agentes etiológicos envolvidos em casos de mastite subclínica no estado de Pernambuco, relacionando os escores do C.M.T. com a freqüência de isolamento bacteriano do leite de vacas com mastite subclínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais : Foram examinadas 43 vacas, totalizando 104 quartos mamários positivos ao CMT, no período de janeiro a março de 1998.

Na maioria dos estabelecimentos a ordenha era realizada em currais de alvenaria, com condições higiênicas inadequadas. Das propriedades visitadas, apenas uma adotava a lavagem e desinfecção do úbere antes e após a ordenha.

Local de realização do experimento: Os animais utilizados no experimento eram procedentes de cinco propriedades localizadas

nos municípios de Gravatá, Recife, Aldeia e Garanhuns.

As amostras de leite foram processadas no Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Colheita das amostras : As vacas em lactação foram submetidas ao teste do CMT para detecção da mastite subclínica, seguindo orientação descrita por SCHALM et al. (1971). A mastite clínica foi detectada através da inspeção e palpação da glândula mamária e exame macroscópico da secreção láctea, utilizando-se os critérios recomendados por ROSEMBERG (1983).

A colheita das amostras para a realização dos exames bacteriológicos foi feita dos quartos mamários que apresentaram reação positiva ao CMT.

Antes da ordenha realizava-se a antissepsia dos quartos mamários através da lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto com álcool etílico a 70° GL. Em seguida colhia-se amostras de cinco mL do leite em tubos rosqueados e esterilizados para lactocultura, inclinados na posição horizontal (BOUCHOT et al. 1985). As amostras obtidas eram identificadas e acondicionadas em caixas de material isotérmico, contendo gelo biológico e em seguida eram transportadas para o laboratório.

Processamento das amostras: As amostras de leite eram homogeneizadas e posteriormente, uma alíquota de 0,01mL era semeada na superfície de ágar (Blood ágar base - Difco) sangue bovino a 5% e incubados em estufa bacteriológica a 37° C, sendo as leituras efetuadas após 24 e 48 horas de incubação.

Inicialmente observaram-se as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise. Ao microscópio eram observados a morfologia, a disposição das células e características tintoriais ao Gram (CARTER 1988; SEARS et al. 1993). Realizava-se a prova da catalase de acordo com

SCHALM et al. (1971), para a diferenciação entre estafilococos e estreptococos.

As bactérias identificadas como *Staphylococcus* eram submetidas à prova de coagulase para diferenciação entre *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa.

Análise estatística:

Foram estimadas as freqüências relativa e absoluta das bactérias isoladas do leite de vaca.

RESULTADOS

Os resultados referentes ao exame microbiológico do leite de vacas procedentes dos municípios de Gravatá, Recife, Aldeia e Garanhuns, encontram-se na tabela 1.

Os resultados relativos à freqüência de exames bacteriológicos positivos em relação aos diferentes escores do C.M.T., encontram-se na tabela 2.

TABELA 1 - Freqüências absoluta e relativa de bactérias isoladas do leite de vacas nos diferentes municípios do Estado de Pernambuco, 1998.

Bactérias Isoladas	F A	F R (%)
<i>Staphylococcus</i> coagulase (+)	26	20,16
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-)	24	18,60
<i>Bacillus</i> sp	14	10,85
<i>Streptococcus</i> sp	06	4,65
<i>Micrococcus</i> sp	02	1,55
<i>Corynebacterium</i> sp	36	27,91
<i>Pasteurella</i> sp	01	0,78
Negativo	20	15,50
TOTAL	129	100 %

FR = Freqüência Relativa

FA = Freqüência Absoluta

TABELA 2 - Relação entre o exame bacteriológico do leite e os escores do CMT

Escore do CMT	Exame bacteriológico				Total N
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
1+	30	66,66	15	33,33	45
2+	33	89,19	04	10,81	37
3+	21	95,45	01	4,55	22

N = N° de amostras

DISCUSSÃO

O resultado do exame microbiológico das 104 amostras de leite provenientes dos 43 animais estudados, demonstrou que as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp foram isoladas de 50 amostras, correspondendo a 38,76% do total dos agentes isolados (Tab. 1). Estes agentes

foram isolados com maior freqüência em vacas com mastite subclínica. Embora existam algumas divergências com relação a freqüência de bactérias isoladas no leite de vacas com mastite clínica e subclínica relatada na literatura (LONGO et al. 1994;

LANGENEGGER et al. 1970; HARROP et al. 1975; FERREIRO et al. 1981; SILVA et al. 1983; NADER FILHO et al. 1985; VIANNI et al. 1992; COSTA et al. 1995), os *Staphylococcus sp* continuam sendo os agentes mais freqüentemente isolados neste tipo de infecção, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas. Verificou-se o isolamento do *Corynebacterium sp* com freqüência relativamente alta (27,91%) no leite dos animais estudados. Estes achados estão de acordo com a citação feita por COSTA et al. 1995, que relataram o isolamento de 21,77% deste agente no leite. Geralmente é isolado em menos de 1% dos quartos quando se adotam “pré e pós dipping”. Esta observação foi condizente com as condições observadas nas propriedades visitadas que geralmente não adotavam medidas higiênicas no pré e pós ordenha das vacas.

Os *Bacillus sp* também tiveram percentual considerável nos isolamentos (10,85%), e devem ser considerados, uma vez que podem estar envolvidos em casos de mastites fatais (JONES & TURNBELL 1981).

Ressalta-se a importância das bactérias isoladas neste estudo, principalmente em casos de mastite subclínica, uma vez que pode ocorrer a possibilidade de transmissão desses agentes ao homem.

Outro aspecto importante a se considerar está diretamente relacionado com as condições precárias de higiene dos animais, instalações e ambiente onde é realizado a ordenha, com a alta

prevalência das mastites subclínicas. Estas, segundo DODD (1983), ocorrem com maior freqüência que a mastite clínica e causam grandes prejuízos econômicos devido à queda na produção de leite pela atrofia do epitélio secretor glandular.

Com relação ao isolamento bacteriano do leite de vacas com mastite subclínica, observou-se que quanto maior o escore do C. M. T. maior a probabilidade de isolamento de agentes (Tabela 2). Os resultados obtidos neste estudo concordam com a citação feita por FAGLIARI et al. (1983), que observaram aumento considerável no grau de concordância entre o C.M.T. e o exame bacteriológico, quando o escore deste teste era mais alto.

CONCLUSÃO

Diante das condições nas quais este estudo foi realizado, e da técnica utilizada, os resultados obtidos permitem concluir que:

- O *Staphylococcus sp* foi o agente isolado com maior freqüência em casos de mastite subclínica de bovinos nos municípios estudados.

- Todas as propriedades visitadas apresentaram alto índice de animais com mastite subclínica, sendo necessária aplicação de medidas higiênico-sanitárias adequadas para controlar as infecções do úbere.

- Quanto maior a reação do C.M.T., maior a probabilidade de isolamento bacteriano do leite de vacas com mastite subclínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. A. et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **J. DAIRY Sci.**, v.79, n. 6, p.1021-1026, 1996.
BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1324p.
BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 15. mastite p. 424 - 463.
BOUCHOT, M. C. et al. Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. **Recueil de Méd. Vet.**, p. 567-577, 1985.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
CENTORBI, O. N. P. de et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. **Rev. Arg. de Microbiol.** v. 24, p. 73 - 80, 1992.
COSTA, B. O. et al. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Bras. Med. Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.21-26, 1995.
COSTA, E. O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comum. Cient. Fac. Med. Vet.**

- Zoot. Univ. S. Paulo**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 21-26, 1991.
- COSTA, O . C. et al. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 5. p. 117-120, 1985.
- FAGLIARI, J. J. et al. Mastite bovina: comparação entre os resultados obtidos pelo “California Mastitis Test” e o exame bacteriológico. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zoot.**, Minas Gerais, v.35, n.3, p. 310-315, 1983.
- FERNANDES, J. C. T. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período 1972- 1989. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, n. 20, p. 151-163, 1992.
- FERREIRO, L. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na “Zona da Mata” do estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 31-37, 1981.
- FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious Mastitis **The vet. clin. of North America: food anim. Pract.**, Philadelphia , v. 9, n. 3, p. 257-295, 1993.
- HARROP, M. H. V. et al. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do Agreste Meridional de Pernambuco. **Pesq. Agrop. Bras. série Vet.**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 65-67, 1975.
- JONES, T. O .; TURNBULL, P. C. B. Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. **Vet. Rec.**, v. 108, p. 271-274, 1981.
- LANGENEGGER, J. et al. Eficácia terapêutica do cefacetile frente aos microrganismos dos gêneros *staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites clínicas. **A Hora Vet.**, v.5, n. 30, p. 24-27, 1986.
- LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.
- LONGO, F. et al. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. **Revue Méd. Vet.** v.145, n.1, p. 43-47, 1994.
- NADER FILHO, A . Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 53-56, 1985.
- RIEDNER, S. et al. Prevalência de mastite em dois tambos de Santa Maria-RS. **Rer. Cent. De Ciên. Rur.**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 261-273, 1987.
- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 329-341.
- SANTOS, J. A . **Patologia especial dos animais domésticos: mamíferos e aves** . 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 154-159.
- SEARS, P. M. et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. **The vet. clin. of North America: food anim. Pract.**, Philadelphia , v. 9, n. 3, p. 445-468, 1993.
- SCHALM, O . W. et al. . **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. cap. 11. p. 249-282.
- SILVA, F. F. da. **Zur dominanz bakterieller mastitiserreger in problembetrieben im bereich der landwirtschaftskammer**. Hannover, 1993. Tese (Doutorado) - Hannover, 1993.
- SISCHO, W. M. et al. Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 202, n. 4, 1993.
- VIANNI, M. da C. E. et al. Frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea. **Arq. Univ. Fed. Rur. RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 187-192, 1992.
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Vet. Microb.** n. 16, p. 41-66, 1988.