



## Mastite subclínica em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás<sup>1</sup>

*Subclinical mastitis in dairy cattle rural properties Goiás*

Juliana Dias Martins<sup>1</sup>, Edmar Soares Nicolau<sup>2</sup>, Albenones José de Mesquita<sup>3</sup>, Eurione Antônio Garcia da Veiga Jardim<sup>4</sup>

<sup>1</sup>.Extraído de dissertação. Universidade Federal de Goiás

<sup>1</sup> Faculdade Anhanguera de Anápolis. julianadias.vet@gmail.com

<sup>2</sup> Professor da Universidade Federal de Goiás. rena@cpa.vet.ufg.br

<sup>3</sup> Professor da Universidade Federal de Goiás e diretor científico da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás.

4. Profissional autônomo.

**Resumo:** A mastite subclínica é um dos principais problemas que afetam a pecuária leiteira, tendo em vista os graves prejuízos acarretados pela diminuição da produção e/ou pela perda dos tetos afetados e aumento da contagem de células somáticas (CCS). Objetivou-se com este estudo identificar as principais bactérias causadoras de mastite subclínica bovina e relacionar os patógenos identificados com a variação da contagem de células somáticas (CCS). Foram analisadas 5.758 amostras de leite de vacas individuais de 7 propriedades localizadas no Estado de Goiás, durante o período de junho de 2010 a junho de 2014, para verificação da CCS e destas 332 amostras foram submetidas a técnica de PCR em tempo real. Concluiu-se que, nas amostras analisadas, houve maior ocorrência de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus* sp e que determinaram maiores valores médios de CCS. A CCS média dos rebanhos com mastite subclínica foi de aproximadamente  $743 \times 10^3$  cel/mL.

**Palavras-Chave:** bactérias, leite, ccs

**Abstract:** The subclinical mastitis is a major problem affecting the dairy industry, in view of the severe impairments caused by reduced production and/or affected by the loss of teats and increased somatic cell count (CCS). The objective of this study to identify the main bacteria that cause bovine subclinical mastitis pathogens identified and relate to the variation of somatic cell count (CCS). We analyzed 5758 samples of milk from individual cows of seven properties located in the State of Goiás, during the period June 2010 to June 2014, for verification of CCS and of these 332 samples were subjected to PRC in real time. It was concluded that in the analyzed samples, a higher occurrence *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus* sp were the agents most frequently identified and determined higher mean values of CCS. The average CCS of cows with subclinical mastitis was approximately  $743 \times 10^3$  cel/mL.

**Key-words:** bacteria, milk, ccs.

Autor para correspondência. E. Mail: Julianadias.vet@gmail.com

Recebido em 9.4.2016. Aceito em 22.8.2016

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160031>

## Introdução

A mastite bovina é um processo inflamatório da glândula mamária decorrente da interação entre animal, agente microbiano e meio ambiente e, basicamente, pode ser classificada em dois tipos: clínica e subclínica. A mastite subclínica caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira, sem que, contudo, se observem sinais de processo inflamatório ou fibrosamento (BRADLEY, 2002; RADOSTITS et al., 2007; SANTOS & FONSECA, 2007; TOZZETTI et al., 2008). Esta forma de manifestação da mastite é a responsável pelos maiores prejuízos na produção leiteira; estima-se que, para cada vaca com mastite clínica, existam em média sete, ou mais, com mastite subclínica (SANTOS & FONSECA, 2007).

O leite apresenta algumas células epiteliais (muito poucas) e algumas células de defesa (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), indicadas pela Contagem de Células Somáticas (CCS). A CCS é um fenômeno dinâmico, estando sujeito a variações significativas. O estágio de lactação, a idade da vaca, a estação do ano, o tamanho do rebanho, o nível de produção de leite e a presença de outras doenças são fatores que podem afetar a concentração de células somáticas no leite. Porém, o fator

que exerce maior influência sobre o nível de CCS do leite é a infecção intramamária (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

A realização periódica de exames laboratoriais do leite pode fornecer dados valiosos sobre a frequência e a prevalência dos agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite subclínica. Para o diagnóstico é necessário a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite tais como CCS, CMT e perfil microbiológico (RADOSTITIS et al., 2007; DIAS, 2007; ROSA et al., 2009).

Nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*), para a detecção de patógenos em alimentos (KNOW et al., 2004; GANDRA, 2006).

A técnica de PCR em tempo real identifica microrganismos e quantifica ácidos nucleicos. A reação é automatizada, a qual pode ser visualizada em alta resolução.

Tem como vantagem a quantificação dos produtos amplificados que podem ser feitas de forma automática analisando a curva de amplificação do fragmento (GILLESPIE & OLIVER, 2005; LUND-OLESEN et al., 2008).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a prevalência das principais bactérias causadoras da mastite bovina subclínica em 10% das vacas, de cada propriedade, através da análise de PCR em tempo real.

### **Material e Métodos**

No período de junho de 2010 a junho de 2014 foram analisadas 5.758 amostras de leite de vacas individuais de 7 propriedades, para verificação da CCS e destas 332 amostras foram submetidas a técnica de PCR em tempo real.

Imediatamente antes da ordenha, após os animais serem submetidos ao teste da caneca telada, os tetos foram higienizados com a solução de *pré-dipping* usada na propriedade. Após a secagem de cada quarto com papel-toalha, procedeu-se a desinfecção do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70°GL, a seguir foi realizada a colheita asséptica da amostra de leite, 40 mL de leite de todos os tetos de cada vaca, em frascos contendo o conservante Bronopol®. Esse conservante é estável em meio ácido e possui largo espectro bactericida sendo efetivo contra bastonetes Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (CHEMICAL, 2011).

Após as colheitas, os frascos foram tampados, identificados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo bolsas de gelo reciclável.

No Laboratório de qualidade do Leite - LQL as amostras para CCS foram analisadas no equipamento Fossomatic 500 Basic (Foss Electric A/S. Hillerød, Denmark) que quantifica a contagem de células somáticas (CCS), com capacidade de análise de 300 amostras/hora e cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo e 10% das amostras de leite de vacas individuais, que apresentaram contagem celular somática acima de 200.000 CS/mL foram submetidas à técnica de PCR em tempo real utilizando o *kit Pathoproof™ Mastitis PCR Assay* (FINNZYMES DIAGNOSTICS®).

### **Resultados e Discussão**

Foram analisadas 5.758 amostras de leite de vacas individuais de 7 propriedades (Abadia de Goiás (A), Anápolis (B), Bela Vista (C), Goiânia (D), Hidrolândia (E), Silvânia (F) e Turvânia (G)), para verificação da CCS. Das amostras de leite de vacas individuais que apresentaram CCS acima de  $200 \times 10^3$  cs/mL, 10% destas foram submetidas à técnica de PCR em tempo real, representando um total de 332 amostras. Os resultados de CCS (pool das amostras de leite dos animais avaliados) observou-se que a fazenda E (70,9%) apresentou a maior frequência de animais com CCS acima de 200.000 cs/mL. Já a fazenda F (49,4%) foi a que teve menor frequência.

Considerando como ponto de corte de CCS acima de  $200 \times 10^3$  cs/mL para classificar animais possivelmente infectados, obteve-se 2442/5758 (42,41%) de amostras que apresentaram resultados inferiores e 3316/5758 (57,59%) superiores a esse valor.

Esses resultados estão em conformidade com os estudos realizado por COENTRÃO et al. (2008), que encontraram 52,0% de amostras com CCS acima desse valor. Os resultados deste trabalho demonstram alto percentual de animais, com a enfermidade em sua forma subclínica.

A contagem média de células somáticas das 5.758 amostras de leite das propriedades foi de aproximadamente  $743 \times 10^3$  cs/mL, com o mínimo registrado de  $422 \times 10^3$  cs/mL em um rebanho, e o máximo de  $1.177 \times 10^3$  cs/mL em outro. COENTRÃO et al. (2008) obtiveram valores da média da CCS individual por rebanho de  $608 \times 10^3$  cs/mL. No entanto, estudos realizados por VIANNA et al. (2002), encontraram valores das médias de CCS de  $469 \times 10^3$  cs/mL de leite de animais com mastite subclínica e já MEDEIROS & SOUZA (2009) identificaram a  $1.631 \times 10^3$  cs/mL.

Conforme médias obtidas da CCS individual por rebanho as fazendas que se observaram maior média de CCS foram fazendas E e A, com os valores  $1.177 \times 10^3$

cs/mL e  $910 \times 10^3$  cs/mL respectivamente. Segundo SANTOS & FONSECA (2007) a alta prevalência de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos leiteiros pode ter impacto negativo sobre a qualidade do leite, pois esse agente provoca grande elevação da CCS (acima de 1.000.000 cs/mL). As propriedades com médias inferiores de CCS foram a fazenda D e F, com os valores de  $422 \times 10^3$  cs/mL e  $508 \times 10^3$  cs/mL respectivamente. O microrganismo gram-positivo isolado com maior frequência absoluta (33/143) foi *Streptococcus agalactiae* na fazenda E e na fazenda A (12/56).

Estes resultados encontram-se respaldos nos dados apresentados por VIANNA et al. (2002) que observaram o gênero *Streptococcus* o agente capaz de elevar a CCS, com média de  $1.094 \times 10^3$  cs/mL. Porém, contagens superiores foram descritas por ELIAS et al. (2005),  $1.800 \times 10^3$  cs/mL, e MEDEIROS & SOUZA (2009) que observaram a CCS média de amostras de leite oriundas de animais infectados por *Streptococcus* spp. com  $1.556 \times 10^3$  cs/mL. SOUZA et al. (2009) relataram  $894 \times 10^3$  cs/mL em animais infectados por esse patógeno.

Enterobactérias representadas, principalmente pelos coliformes, como a *E. coli* e *Klebsiella* spp. compuseram o grupo das Gram-negativas. Foi identificada a presença de *E. coli* com frequência de

57% (4/7) das fazendas. Estas bactérias são apontadas como importantes agentes das mastites ambientais (PRESTES et al., 2002), e são constituintes da microbiota intestinal tanto do homem como dos animais. Constatou-se a maior frequência desses microrganismos na fazenda E em 63,41% (26/41) (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo

de COSTA et al. (2006) sendo identificada em 75% (15/20). O aumento da frequência de *E. coli* pode ser atribuído ao manuseio direto dos animais, como o toque na cauda, contato com úbere sujo e fezes na sala de ordenha. O segundo microrganismo mais isolado foi a *Klebsiella* sp. com uma frequência de 43% (3/7) das fazendas estudadas.

**Tabela 1.** Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-negativos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda E localizada no município de Hidrolândia-GO. Goiânia-GO, 2014.

Microrganismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Klebsiella oxytoca/ K. pneumoniae</i>	8	19,51
<i>Serratia marcescens</i>	7	17,08
<i>Escherichia coli</i>	26	63,41
<b>Total</b>	41	100

Na Tabela 2 estão expressos os microrganismos isolados das amostras de leite com CCS acima de  $200 \times 10^3$  cs/mL oriundas das 7 propriedades leiteiras estudadas. Das 332 amostras de leite obtidas, dentre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus uberis* foram os microrganismos mais isolados nas fazendas (15,2%), seguido por *Enterococcus sp.* e *Streptococcus agalactiae* (11,6%), *Corynebacterium bovis* (7,3%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,8%), *Staphylococcus aureus* (4,8%) e *Arcanobacterium pyogenes* (4,5%). Para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (9,5%) foi o microrganismo mais isolado,

seguido por *Klebsiella* sp. (8%) e *Serratia marcescens* (5,5%).

Observando-se na Tabela 2, a predominância de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus uberis* sobre os demais microrganismos, com 15,2% do total de microrganismos isolados. Estes resultados estão inferiores aos relatados por REIS et al. (2003), 43,1%, SANTOS et al. (2006), 39,13% e COSTA (2010), 37,5% de *Staphylococcus spp.*

Essas diferenças nas frequências dos patógenos isolados podem ser atribuídas a fatores relacionados ao manejo e ao sistema de criação.

Segundo Bramley & Dodd (1984);

Harmon (1998); Wilson et al. (1998); Fonseca & Santos (2000); Santos (2001) esses agentes estão relacionados entre os principais causadores de infecções subclínicas, ocasionando expressivos aumento na contagem de células somáticas, o que representa grave comprometimento da produção e da qualidade do leite, gerando sérios prejuízos ao sistema de produção.

O conhecimento da etiologia é importante para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento dos futuros casos de mastite bovina e a técnica de PCR em tempo real permitiu a detecção dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica proporcionando maior agilidade na tomada de decisão quanto ao tratamento e controle da doença.

**Tabela 2.** Frequência (absoluta e relativa) de patógenos isolados de 332 amostras de leite de fêmeas bovinas, em 7 propriedades leiteiras, durante os meses de junho de 2010 a junho de 2014.

Patógenos isolados	Frequência absoluta	Frequência relativa(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	4,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	123	11,6
<i>Corynebacterium bovis</i>	78	7,3
<i>Enterococcus sp.</i>	123	11,6
<i>Arcanobacterium pyogenes/</i>	46	4,5
<i>Peptococcus indolicus</i>		
<i>Streptococcus uberis</i>	161	15,2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	72	6,8
<i>Staphylococcus spp.</i>	161	15,2
<i>Klebsiella sp.</i>	84	8,0
<i>Serratia marcescens</i>	57	5,5
<i>Escherichia coli</i>	100	9,5
Total	1.056	100,0

### Conclusão

A mastite subclínica é predominante nas propriedades e tanto os agentes contagiosos como ambientais estão contribuindo para este tipo de infecção. O *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus sp* foram os agentes mais frequentemente isolados e que determinaram maiores valores médios de CCS.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq.

### Referências

- BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. Journal.**, 164:116-128.2002.
- BRAMLEY, J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **J D Res.**, 51:481-512. 1984

3. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.M.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; 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.
4. COSTA, E.O.; SANTOS, F.G.B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.R.P.; PERES, A.A.C.; RAIÁ, R.B. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismo do Gênero *Staphylococcus*, estimada por escores de CMT e CCS, na composição do leite: gordura, proteína e lactose. **Revista Nappama, São Paulo**, v.9, p13-18, 2006.
5. COSTA, A.C. **Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
6. DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.
7. ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 8, n. 2, p. 165-170, 2005.
8. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**, São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
9. GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para Detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em Leite UHT Artificialmente Contaminado**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Brasil. 69 p. 2006.
10. GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal Dairy Science**, v.88, p.3510-3518. 2005.
11. HARMON, R.J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1998. p. 7-15.
12. KWON, N.H.; KIM, S. H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, 97: 137-145.2004.
13. LUND-OLESEN, T.; DUFVA, M.; DAHL, J.A.; COLLAS, P.; HANSEN, M.F. Sensitive on-chip quantitative real-time PCR performed on an adaptable and robust platform . **Biomedical Microdevices**, v. 10, pp 769-776, 2008.
14. MEDEIROS, M.I.M.; SOUZA, L.C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.
15. PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.
16. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, n. 1, p. 118-132. 2002.

17. RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 1737 p.
18. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v55n6/19370.pdf>> Acesso 05 de Nov. 2011.
19. ROSA, M.S.; COSTA, M.J.R.P.; SANT'ANNA, A.C.; MADUREIRA, A.P. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha**. Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.
20. SANTOS, M.V. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In: 2 encontro anual do conselho brasileiro de qualidade do leite e 5 simpósio internacional sobre produção intensiva de leite, 30 de agosto a 1 de setembro de 2001. **Anais...** p.115-127, Belo Horizonte, MG.
21. SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, C.A.F.; LIMA, Y.V.R.; BOTARO, B.G. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1486 – 1493, 2006.
22. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.
23. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.5, p. 1015-1020, 2009.
24. TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. Garça: FAEF. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódicos Semestral.
25. VIANNA, L.C.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; SALVADOR, R.; DIAS, J.A. Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 3-8, 2002.
26. WILSON, D.J.; CASE, K.L.; GONZALEZ, R.N. Bacteriologic cure rates for bovine mastitis cases with no treatment or with eight different antibiotics. **National mastitis council annual meeting proceedings**, v.37, p.273-274. 1998.