

Estudo comparativo entre os testes CCS, CMT e microbiológico para o diagnóstico de mastite subclínica

Comparative study among CCS, CMT and microbiological tests for the diagnosis of subclinical mastitis

Maicon Lucas Souza Alves

Graduando do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM). e-mail: maicon.lucas2011@hotmail.com

Walter Vieira Cunha

Doutor em Genética e Biotecnologia; Docente do curso de Agronomia (UNIPAM).
e-mail: walter@unipam.edu.br

Maria Rejane Borges Araújo

Especialista em Gestão Ambiental; Docente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM).
e-mail: mariarejane@unipam.edu.br

Resumo: Mastite é uma enfermidade de caráter multifatorial e pluri-etiológica. De acordo com o mecanismo de transmissão, pode ser classificada em contagiosa e ambiental, e conforme a manifestação, é classificada como clínica e subclínica. Os métodos California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) são fundamentais para o diagnóstico da mastite subclínica. Esta pesquisa comparou métodos de detecção de mastite subclínica bovina CCS (Somaticell®), CMT e lactocultura em rebanho leiteiro no município de Carmo do Paranaíba-MG. Foram avaliados 64 animais dos quais 56,25% apresentaram mastite subclínica por microrganismos do gênero *Staphylococcus* sp e 53,125% apresentaram CCS acima do valor preconizado pela IN 62/2011. Com a utilização do Somaticell® e CMT foi possível verificar de forma rápida e objetiva os animais com probabilidade de infecção na glândula mamária, servindo como base para a instauração de métodos mais eficazes de higiene e profilaxia.

Palavras-chave: Lactocultura. Qualidade do leite. Saúde animal. Somaticell®.

Abstract: Mastitis is a multifactorial and pluri-etiological disease. According to the transmission mechanism, it may be ranked into contagious and environmental, and according to the manifestation, it is classified as clinical and subclinical. Methods such as California Mastitis Test (CMT) and somatic cell count (SCC) are essential for the diagnosis of subclinical mastitis. This study compared methods of bovine subclinical mastitis detection, such as CCS (Somaticell®), CMT and lactoculture in a dairy herd in the city of Carmo of Paranaíba-MG. 64 animals were evaluated, of which 56.25% had subclinical mastitis by microorganisms of the genus *Staphylococcus* sp and 53.125% had SCC up the value recommended by the IN 62/2011. Using the Somaticell® and CMT, it was possible to verify quickly and objectively animals with probability of infection in the mammary gland, which served as a basis for the establishment of more effective methods of hygiene and prophylaxis.

Keywords: Milk culture. Milk quality. Animal health. Somaticell®.

1. Introdução

A mastite bovina é a doença que mais onera a exploração de animais destinados à produção de leite, e a prevenção, o controle e o tratamento dessa doença são de fundamental importância para a pecuária leiteira (PEIXOTO *et al.*, 2013). É um agravo influenciado por uma variedade de fatores não inter-relacionados, tais como a conformação do úbere, as condições dos esfíncteres dos tetos, o estado imunitário dos animais, as condições de higiene da ordenha, os procedimentos de ordenha, as condições de manutenção da ordenhadeira mecânica e as condições de higiene do ordenhador (EMBRAPA, 2015).

Sua incidência é predominante em rebanhos leiteiros de todo o mundo, causando prejuízos econômicos e sanitários para produtores e laticínios. Além disso, a doença pode representar um potencial risco de saúde pública e de terneiros, uma vez que o leite pode servir como veiculador de microrganismos patogênicos e toxinas produzidas pelos microrganismos no leite contaminado (ZAFALON *et al.*, 2009; CHAGAS *et al.* 2012; VIEIRA *et al.* 2013; BRITO *et al.* 2014).

A mastite apresenta etiologia de origem tóxica, traumática, metabólica, fisiológica, alérgica, infecciosa, prevalecendo à infecção por bactérias, mas vírus, fungos e algas também podem causar mastite, mesmo que em menor incidência. No processo patogênico da mastite, os microrganismos infecciosos penetram através do canal e dos esfíncteres do teto, os quais possuem propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão, sendo esses a primeira barreira contra a invasão bacteriana (PEIXOTO *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2014; EMBRAPA, 2015).

Estes microrganismos penetram ali e se multiplicam, e a resposta imunológica recruta em seguida as células de defesa principalmente os leucócitos para o local, na tentativa de reverter o processo. Esse processo promove o aumento dessas células de defesa juntamente com as células descamadas dos alvéolos glandulares, denominados células somáticas. A elevada contagem de células somáticas (CCS), principal característica da mastite, promove a alteração das propriedades físico-químicas do leite (PEIXOTO *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2014; EMBRAPA, 2015).

Ribeiro Júnior *et al.*, (2008); Nickerson (2009); Peixoto *et al.*, (2013) comentam a respeito do mecanismo de transmissão da enfermidade, que pode ser classificada em mastite contagiosa, quando a transmissão do microrganismo se dá de um animal para outro através de fômites; e mastite ambiental, quando a transmissão do microrganismo ocorre do ambiente para a glândula mamária por meio de fômites ou não.

Conforme a sua manifestação, a doença pode ser classificada como clínica e subclínica. A mastite clínica é marcada por respostas inflamatórias mais severas, que resultam em mudanças no aspecto da secreção láctea, em mudanças visíveis no tecido mamário e, em alguns casos, em efeitos sistêmicos como hipertermia, prostração e tremores musculares. Já a mastite subclínica é desprovida de sinais clínicos, não apresenta reações macroscópicas detectáveis no leite, porém, apresenta alterações químicas e microbiológicas (PEIXOTO *et al.*, 2013).

Os métodos California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) são fundamentais para o diagnóstico da mastite subclínica, elucidando os leucócitos como elemento principal nas suas determinações, entre outros fatores como a idade

da vaca, o estágio de lactação e a ordem do parto, que podem influenciar nos resultados. No entanto, o estado da infecção é o principal responsável pela variação da CCS (EMBRAPA, 2012; ÁLVAREZ; CASSOLI; MACHADO, 2013). E o método difundido mundialmente para caracterização dos microrganismos envolvidos no processo infeccioso da mastite ressalta a cultura microbiológica (BRASIL, 2011).

Devido ao potencial risco de saúde pública e de terneiros, e levando em conta os prejuízos causados pela mastite subclínica, mediante a redução na produção e na qualidade do leite, esta pesquisa comparou métodos de detecção de mastite subclínica bovina CCS, CMT e lactocultura em rebanho leiteiro no município de Carmo do Paranaíba – MG.

2. Material e métodos

A pesquisa foi realizada em animais de uma propriedade leiteira, de média tecnificação, que aplica as boas práticas agropecuárias, com predomínio de rebanho holandês, localizada do município de Carmo do Paranaíba – MG. Sessenta e quatro animais foram encaminhados à sala de ordenha e, conforme rotina, procedeu-se à antisepsia dos quartos mamários e coletou-se manualmente três jatos de leite de cada teto em raquete própria para realização do teste Califórnia Mastitis Test (CMT), analisando-se a frequência dos casos de mastite subclínica (1+, 2+, 3+) de acordo com SCHALM; NORLANDER (1957).

Para a quantificação da CCS, coletou-se leite dos quatro tetos em um tubo Falcon, utilizando-se uma alíquota de 2mL de amostra do tubo Falcon de acordo com método do fabricante do kit Somaticell®. Ao término dos testes de diagnóstico de CCS e CMT, as amostras foram transportadas ao laboratório Microbiologia D do UNIPAM, Patos de Minas, para análise microbiológica, e os animais foram liberados para a pista de alimentação.

Para essas análises, foi transferida uma alíquota de 2mL de cada amostra para microtubos de 2mL cada, submetidos à centrifugação por quatro minutos a 8.000rpm (BRASIL, 2003).

As análises microbiológicas seguiram o estabelecido na IN62 do MAPA (BRASIL, 2003), com adaptações. Inoculou-se pelo método de esgotamento/estria uma alçada de 10µL na superfície de ágar Baird-Parker (BP). Incubaram-se todas as placas em estufa bacteriológica a 35,5°C +/- 2°C/48hrs. Realizou-se a leitura e procedeu-se à identificação. As bactérias identificadas como *Staphylococcus* sp foram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase, teste de coagulase e DNase.

3. Resultados e discussão

Cortinhas *et al.* (2013) discorrem sobre a necessidade da melhoria da qualidade do leite, sendo esta uma preocupação crescente no cenário nacional. A qualidade do leite bovino abarca aspectos microbiológicos e físico-químicos, desde a lactação até o

processamento e comercialização. A indústria utiliza como critério da avaliação da qualidade do leite técnicas de contagem de células somáticas (CCS) e lactocultura.

Os animais avaliados frente aos testes de contagem de células somáticas (CCS), Califórnia Mastitis Test (CMT) e lactocultura demonstraram percentuais de mastite subclínica diferentes, conforme se observa na Tabela 1. A lactocultura revelou 56,25% de cultura positiva para o gênero *Staphylococcus* sp, dos quais 15,62% correspondem ao *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1 – Percentual de 64 animais reagentes em CCS e CMT e positivos para a lactocultura de propriedade no município de Carmo do Paranaíba – MG

Nº de células somáticas	CCS	lactocultura		Escore de reação	CMT
		<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus aureus</i>		
69.000 até 100.000	46,87	12,50	4,68	+	79,69
101.000 até 200.000	21,87	12,50	3,12	++	7,81
201.000 até 1.970.000	31,25	15,62	7,81	+++	12,50

A instrução normativa nº 62 de 29/12/2011 define que o leite cru refrigerado, a partir de 01/07/14 até 30/06/16, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, se enquadra nos parâmetros para a contagem de células somáticas no limite de 5×10^5 CCS/mL. A partir de 01/07/16 preconiza-se que o leite cru refrigerado não apresente mais que 4×10^5 CCS/mL (MAPA, 2011). Devido a essa determinação, os animais avaliados no presente estudo foram divididos em três grupos.

Harrop *et al.* (1975) foram os pioneiros na utilização do Califórnia Mastitis Test e avaliaram amostras de 860 vacas em 20 fazendas de seis municípios do agreste de Pernambuco. Corroborando com esta pesquisa, seus resultados demonstraram que 338 das 860 vacas (39,0%) apresentavam algum tipo de distúrbio mamário; 275 animais (31,7%) apresentavam a infecção. O *Staphylococcus aureus* foi isolado de 103 vacas (59,2%) com o a lactocultura. Dos 2.997 quartos examinados, 437 (14,5%) estavam com mastite, o que indicou a incidência média de 1,58 quartos infectados por vaca.

Brito (2014), em estudo semelhante, avaliou amostras de leite de 217 vacas de 14 propriedades localizadas em São Luís, Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa, utilizando-se a caneca de fundo escuro e o Califórnia Mastitis Test (CMT). A partir dos testes anteriormente citados, os animais positivos foram selecionados para avaliação microbiológica. Dos 857 quartos mamários avaliados, 27 (3,12%) apresentaram mastite clínica, e 215 (25,08%) foram comprovados com mastite subclínica. Das amostras reagentes para o CMT, 69 apresentaram escore 1+, 103 escores 2+ e 43 escore 3+. Das 242 amostras de leite destinadas à microbiologia, 204 (84,29%) apresentaram crescimento

de microrganismos e em 38 (15,70%) não houve crescimento. O microrganismo *S. aureus* foi isolado em 14,23% das amostras colhidas.

Medeiros *et al.* (2008) realizaram estudo semelhante no Recife; para o exame microbiológico, 25,6% das amostras foram consideradas negativas e 74,4% positivas. Com auxílio do Somaticell® quantificou-se a CCS, de acordo com o fabricante, observando-se que um maior percentual (35,7%) para as 308 amostras analisadas se enquadrava entre 69.000 até 200.000 células somáticas, 7,5% do rebanho detinham CCS entre 200.000 e 400.000, 23,1% dos animais demonstraram CCS entre 400.000 até 1.200.000, e 32,1% do rebanho apresentavam CCS acima de 1.200.000 células.

Medeiros *et al.* (2008) compararam os resultados do Somaticell® frente ao CMT, observando uma sensibilidade de 99,51%, enquanto que a especificidade é de apenas 3,8%. Verificou-se a ocorrência de 205 coincidências entre o Somaticell® e o CMT, e destas amostras coincidentes, 201 já haviam sido positivas aos dois métodos. Das 103 amostras não coincidentes, 102 foram positivas pelo Somaticell® e negativas ao CMT. Em relação ao Somaticell® verificou-se que a sensibilidade deste em relação à lactocultura é de 99,12%, enquanto que a especificidade é de apenas 3,8%. De todas as avaliações, houve 230 coincidências entre os exames Somaticell® e a lactocultura, e destes, 227 amostras foram positivas. Das 78 amostras não coincidentes, 76 foram reagentes ao Somaticell® e não reagentes ao exame microbiológico.

4. Conclusão

Considerando a dinâmica e a necessidade de resultados imediatos, a contagem de células somáticas demonstra maior viabilidade. Com a utilização do Somaticell®, foi possível verificar de forma rápida e objetiva os animais com probabilidade de infecção na glândula mamária; assim como o CMT que, de rápida e fácil execução, demonstrou os animais reagentes.

Aliar os três métodos torna-se importante para o monitoramento de animais, aumentando as chances de sucesso nos tratamentos, reduzindo a probabilidade de perdas e servindo como base para a instauração de métodos mais eficazes de higiene e profilaxia.

Referências

ÁLVAREZ, J. C. E.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. O rebanho e a ordenha como fatores de risco da mastite no Brasil – resultados preliminares. *Vet. e Zootec. Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL*. 10 a 12 de junho de 2013, pp. 76-77.

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA 062. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF, 26 de ago. 2003.

BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA 062, de 29 de dezembro de 2011.

BRITO, D. A. P.; OLIVEIRA, I. S. S.; BRITO, D. R. B.; COSTA, F. N. Prevalência e etiologia da mastite em bovinos leiteiros da Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Brasil, 2014. *Rev. Bras. Med. Vet.*, out/dez 2014.

CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; BARBOSA, N. G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, D. V. D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. E *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil, 2012. *Biosci. J.*, Uberlândia, 28(6):1007-1014, nov./dez. 2012.

CORTINHAS, C. S.; MACEDO, S. N.; ORSI, A. M.; MESTIERI, L.; SANTOS, M.V. Efeito da contagem de células somáticas sobre a contagem de *Staphylococcus* e *Streptococcus* em leite de tanque. *Vet. e Zootec. Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL*. 10 a 12 de junho de 2013, pp. 130-131.

EMBRAPA, 2012. Mastite bovina, considerações e impactos econômicos. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA*. Embrapa Tabuleiros Costeiros; Aracaju, SE. 2012.

EMBRAPA, 2015. Panorama do leite. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA*. Embrapa Gado de Leite; Juiz de Fora, MG. Ano 7, nº 75, outubro/2015.

HARROP, M. H. V.; PERIERA, L. J. G.; BRITO, J. R. F.; MELO, A. M. B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. *Pesq. Agrop. Bras. série Vet.* 1975.

LAGE, C. F. A.; MALACCO, V. M. R.; MOLINA, L. R. Análise do risco de infecção por *Staphylococcus aureus* em vacas leiteiras em diferentes estágios de lactação. *Vet. e Zootec. Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL*. 10 a 12 de junho de 2013, pp. 60-61.

MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; PEIXOTO, R. M.; SILVA FILHO, A. P.; FARIA, E. B.; MOTA, R. A. Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell® nodiagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros, 2008. *Medicina Veterinária*, Recife, 2(2):16-22, abr./jun. 2008.

MELO, P. C.; NADER-FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina, 2012. *Biosci. J.*, Uberlândia, 28(1):94-99, jan./fev. 2012.

NICKERSON, S. C. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2):128-135, fev./2009.

OLIVINDO, C. S.; CHAPAVAL, L.; VILLARROEL, A. B. S.; ALVES, F. S. F.; SOUSA, F. G. C.; FERNANDES, E. P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra, *R. Bras. Zootec.*, 38(7):1317-1321, 2009.

PEIXOTO, A. F.; NETO, A. L. S.; SILVA, A. B.; OLIVEIRA, J. M. B., BRANDESPIM, D. F., JÚNIOR, J. W.P. Etiologia da mastite bovina em propriedades rurais do município de Lagoa do Ouro, (microrregião de Garanhuns) – PE. *Vet. e Zootec. Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL*. 10 a 12 de junho de 2013, pp. 58-59.

RIBEIRO JÚNIOR, E.; SILVA, M. H.; VIEGAS, S. A. A.; RAMALHO, E. J.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, F.C. S. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. *Rev. Bras. Saúde Prod.*, 9(4):680-686, out/dez, 2008.

SANTANA, E. H. W. *Determinação do perigo de consumo de leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica*. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2006.

SCHALM , O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc*. 130(5):199-204, Mar. 1957

VIEIRA, B. C. R., LORENZONI, L. S.; SOUZA, M. H.; ALFAIATE, M. B.; XAVIER, T. M. T. Etiologia infecciosa associada à mastite subclínica em bovinos de propriedades rurais no município de Alegre – ES, 2013. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 9(16):1154-1172, 2013.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; VESCHI, J. L. A. *Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 68(2):269-77, 2009.