



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ
Centro de Ciências Agrárias e Biológicas
Mestrado em Zootecnia

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICO PARA MASTITE SUBCLÍNICA
CAPRINA EM SOBRAL/CE

JOSÉ WELLINGTON FONTINELE MOURA

SOBRAL - CE
JULHO - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICO PARA MASTITE SUBCLÍNICA
CAPRINA EM SOBRAL/CE

JOSÉ WELLINGTON FONTINELE MOURA

SOBRAL - CE
JULHO - 2016

JOSÉ WELLINGTON FONTINELE MOURA

AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICO PARA MASTITE SUBCLÍNICA
CAPRINA EM SOBRAL/CE

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Zootecnia, da Universidade
Estadual Vale do Acaraú, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Zootecnia.

Área de concentração:
Produção animal

ORIENTADORA:
PROF^a. DRA. ANA SANCHA MALVEIRA BATISTA
CO-ORIENTADORA:
DRA. VIVIANE DE SOUZA

SOBRAL - CE
JULHO - 2016

Bibliotecário Responsável: Neto Ramos CRB 3/1374

M884a

Moura, José Wellington Fontinele

Avaliação de testes diagnóstico para mastite subclínica caprina em Sobral/CE / José Wellington Fontinele Moura. – Sobral, 2016.

94 f.: il. color.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Sancha Malveira Batista

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Viviane de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Mestrado em Zootecnia, 2016.

1. Condutividade elétrica. 2. Células somáticas. 3. Caprinos. 4. Staphylococcus spp. I. Batista, Ana Sancha Malveira. II. Souza, Viviane de. III. Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Mestrado em Zootecnia. IV. Título.

CDD 636.391

JOSÉ WELLINGTON FONTINELE MOURA

AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICO PARA MASTITE SUBCLÍNICA
CAPRINA EM SOBRAL/CE

Dissertação defendida e aprovada em: 22 de julho de 2016 pela Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dra. Ana Sancha Malveira Batista
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Dra. Viviane de Souza
EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Prof^ª. Dra. Ângela Maria de Vasconcelos
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Dra. Patrícia Yoshida Faccioli Martins
EMBRAPA Caprinos e Ovinos

SOBRAL - CE
JULHO - 2016

Dedico

A minha bisavó *Maria Ximenes* por
seus conselhos sábios e por eu estar
sempre em suas orações.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Vale do Acaraú pela oferta do curso de graduação e pós-graduação.

À Deus por me dar o dom do conhecimento e pelas oportunidades que tive ao longo da minha vida.

Aos meus pais, *Lucilene Albuquerque Fontinele* e *Fransquin Ferreira Moura* e irmãos *César Fontinele* e *Wescley Fontinele* por me apoiarem e terem acreditado em mim, sempre dando incentivo para conquistar meus sonhos.

À minha cunhada *Mônica Fontinele* e minhas sobrinhas queridas *Yasminie Fontinele*, *Ana Júlia Fontinele* e *Larissa Fontinele*, por me fazerem bem mesmo estando distante.

Ao meus amigos, *Raimundo Azevedo*, *Tamiles Maria*, *Joice Melo*, *Paulo Vasconcelos*, *Ananias Martins*, *Euclides Rafael*, e *Rebeca Almeida* por estarem ao meu lado nessa estrada da vida. Obrigado pela amizade.

À minha Orientadora e Professora *Ana Sancha Malveira Batista*, a qual tenho muito carinho e confiança.

À minha Co-orientadora da EMBRAPA Caprinos e Ovinos Viviane de Souza pela oportunidade e confiança dada de trabalharmos juntos.

À Professora da Coordenação de Zootecnia, *Fátima Révia* pelos conselhos, incentivos aos estudos e exemplo de determinação e esforço.

À Capes pelo auxílio da bolsa.

Aos bolsistas, *Darciane Rodrigues* e *Caio César* pela ajuda durante a realização do experimento.

À Laboratorista *Liana Maria Ferreira da Silva* pela atenção e ensinamentos durante o experimento.

Ao *Senhor Zequinha*, pela ajuda durante as coletas.

À EMBRAPA por disponibilizar os laboratórios e os animais.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que tornasse possível.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ WELLINGTON FONTINELE MOURA – Filho de Francisco Ferreira Moura e Lucilene Albuquerque Fontinele, nasceu em Tianguá-CE em 18 de maio de 1991, se formou em Zootecnia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e Técnico em Agroindústria pelo Instituto Federal do Ceará - IFCE em 2014. No mesmo ano ingressou no Mestrado Acadêmico em Zootecnia na área de concentração em produção animal.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE GRÁFICO.....	XIII
RESUMO GERAL	XIV
GENERAL ABSTRACT	XV
CONSIDERAÇÕES GERAIS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	18
INTRODUÇÃO	19
1 Glândula mamária	20
2 Composição do leite de cabra	21
3 Mastite	22
4 Métodos de diagnóstico da mastite subclínica caprina	24
5 Avaliação microbiológica.....	24
6 <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	25
7 Detecção do teor de cloretos.....	26
8 Condutividade elétrica (CE) e pH.....	27
9 Contagem de células somáticas (CCS)	28
OBJETIVO.....	32
1 Objetivo geral	32
2 Objetivo específico	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DAS AMOSTRAS DE LEITE DE CABRAS SAANEN E ANGLO NUBIANA OBTIDAS PELO MÉTODO ELETRÔNICO, CALIBRADO COM PADRÃO DE LEITE BOVINO, EM RELAÇÃO À CONTAGEM MICROSCÓPICA DIRETA	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
1 Seleção dos animais e coleta das amostras de leite	45
2 Exame clínico da glândula mamária, testa da caneca telada e antissepsia dos tetos antes da ordenha	46
3 Realização do <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	47
4 Contagem de Células Somáticas (CCS)	47
4.1 Método microscópico	47
4.2 Método eletrônico	49
5 Isolamento das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp.	49
5.1 Identificação e isolamento das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp.	49
5.2 Teste da catalase	50
5.3 Teste da coagulase livre em tubo	50
5.4 Teste de Voges-Proskauer	51
6 Análise estatística	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5 Contagem células somáticas	53
5.1 Método microscópico	53
5.2 Método eletrônico	54
6 Teste de diagnóstico.....	58

CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CAPÍTULO 3 - CARACTERÍSTICAS CELULARES DO LEITE DAS FÊMEAS POR MEIO DA REALIZAÇÃO DA PROVA DO CMT, TEOR DE CLORETOS, CE, pH EM RELAÇÃO AO ISOLAMENTO DE <i>Staphylococcus</i> spp	65
RESUMO	66
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	70
1 Seleção dos animais e coleta das amostras de leite.....	70
2 Exame clínico da glândula mamária, teste da caneca telada e antissepsia dos tetos antes da ordenha.....	71
3 Realização do <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	72
4 Teor de cloretos.....	73
5 pH e Condutividade Elétrica (CE).....	73
6 Isolamento das estirpes <i>Staphylococcus</i> spp.....	74
6.1 Identificação e isolamento das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp.....	74
6.2 Teste da catalase.....	75
6.3 Teste da coagulase livre em tubo.....	75
6.3 Teste de Voges-Proskauer.....	76
7 Análise estatística.....	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
8 Isolamento Microbiológico.....	78
9 Exame clínico da glândula mamária e teste <i>California Mastitis Test</i>	79
10 Cloretos.....	81
11 Condutividade Elétrica e pH.....	83
12 Testes de diagnóstico para mastite subclínica	82
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	Página
Tabela 1: Composição físico-química média dos leites de caprino, ovino, bovino e humano (por 100g)	22
Tabela 2: Requisitos físico-químicos do leite de cabra cru refrigerado: segundo a Instrução Normativa nº 37	22
Tabela 3: Contagem de células somáticas como parâmetro de qualidade para o leite de cabra em Israel, 2008	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Possíveis resultados para um teste de diagnóstico	52
Tabela 2: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método microscópico.....	53
Tabela 3: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método eletrônico.....	54
Tabela 4: Contagem de células somáticas pelo método eletrônico e microscópico no leite de cabras de diferentes raças e período de lactação	57
Tabela 5: Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina.....	58

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Possíveis resultados para um teste de diagnóstico	77
Tabela 2: Reação ao <i>California Mastitis Test</i> das metades mamárias de cabras leiteiras de diferentes raças em diferentes períodos de coleta.....	79
Tabela 3: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp., em número absoluto e respectiva porcentagem, encontrados no cultivo microbiológico seletivo no leite avaliado, de acordo com o <i>California Mastitis Test</i>	80
Tabela 4: Teor de cloretos obtidos no leite entre diferentes raças com e sem isolamento microbiológico.....	81
Tabela 5: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. encontrados no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teor de cloretos.....	82
Tabela 6: Teor de cloretos no leite de cabra de diferentes raças e estágio de lactação	82

Tabela 7: Condutividade Elétrica (CE) e pH em leite de cabras Anglo Nubiana e Saanen	83
Tabela 8: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teste de Condutividade Elétrica	84
Tabela 9: Comparação do teste de Condutividade Elétrica e pH entre as raças durante a curva de lactação	85
Tabela 10: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. encontrados no cultivo microbiológico de leite de cabras de acordo com o pH	86
Tabela 11: Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

	Página
Figura 1: a: Representação da glândula mamária b: alvéolos e c: secreção apócrina	21

CAPÍTULO 2

Figura 1: Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento.....	46
Figura 2: Teste da caneca telada.....	46
Figura 3: Reação positiva ao CMT	47
Figura 4: Referência dos elementos celulares para contagem microscópica de células somáticas presentes no leite: A (Hemácias); B (Linfócito); C (Monócito); D (Eosinófilo); E (Basófilo); F (Neutrófilo – polimorfonucleares)	48
Figura 5: Contagem de células pelo método microscópico: A-lâminas coradas com <i>pyronine Y-methyl green</i> ; B-contagem das células por meio da microscopia óptica; C-células somáticas (azul); D-células de descamação (vermelha)	48
Figura 6: Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp., em meio agar Baird-Parker	50
Figura 7: Teste da catalase em colônias isoladas	50
Figura 8: Teste de coagulase livre em tubo a-Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo	51
Figura 9: Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer	51

CAPÍTULO 3

Figura 1: Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento	70
Figura 2: Teste da caneca telada.....	72
Figura 3: Reação positiva ao CMT.....	72
Figura 4: Teste de cloretos em leite de cabra: a - Titulação da amostra de leite b - coloração alaranjado-escuro após a titulação como indicador de excesso de íons de prata	73
Figura 5: Lactoscan SA para os testes pH e CE.....	74
Figura 6: Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp., em meio agar Baird-Parker	75
Figura 7: Teste da catalase em colônias isoladas.....	75
Figura 8: Teste de coagulase livre em tubo a-Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo	76

Figura 9: Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer.....	76
Figura 10: <i>Staphylococcus</i> spp. Cocos gram-positivo em forma de cachos de uva.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

	Página
Gráfico 1: Regressão linear entre a CCS automática e microscópica	56

RESUMO GERAL

Atualmente existem testes diagnósticos eficientes que detectam a mastite subclínica em bovinos, porém, para caprinos os métodos ainda são controversos por apresentarem resultados falso-positivos, sendo necessário portanto, avaliação dos testes disponíveis para inferir confiabilidade ao diagnóstico da enfermidade. Foram coletadas amostras mensais durante seis meses, de 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11). As coletas foram realizadas individualmente, por teto, totalizando 232 amostras de leite, nas quais foram realizadas pesquisa de *Staphylococcus* spp., teste de condutividade elétrica (CE), pesquisa do teor de cloretos, pH e a contagem de células somáticas (CCS) pelo método microscópico e eletrônico. Usou-se um delineamento inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo Teste F a 5% para raças e Tukey a 5% para o período. Avaliou-se também a correlação entre as variáveis CCS microscópica e CCS eletrônica utilizando a correlação de Pearson, considerando-se um nível de significância de 5%. Um modelo de regressão linear foi usado para avaliar a concordância entre a CCS automática e microscópica. Para sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico. Foi possível observar correlação positiva entre os parâmetros CCS eletrônica e CCS microscópica de $r=0,88$ e associação de $R^2=0,77$ ($p<0,0001$). A CCS pelo método eletrônico superestimou 2,2 vezes a CCS microscópica. A CCS obtida pelo método microscópico utilizando o corante pyronina Y-verde de metila foi a mais confiável e os métodos de CCS analisados apresentam alta correlação linear crescente entre si. O teste CMT não é recomendado para o diagnóstico por apresentar sensibilidade de 61,1% e especificidade de 43%, considerados baixo. A CE acusou 100% dos animais verdadeiramente sadios, indicando que pode ser recomendado como prova de triagem para mastite subclínica. A prevalência de mastite subclínica causada por estafilococos coagulase-negativa foi de 8%. Os resultados encontrados para o teste de cloretos apresentaram sensibilidade de 88,8% e especificidade de 9,3%, das 210 amostras analisadas que apresentaram média superior a 0,221, 194 (92,0%) não apresentaram isolamento microbiológico, não sendo portanto eficiente em identificar cabras com mastite subclínica. O pH foi superior nas amostras com isolamento bacteriano, independente da raça.

Palavras-Chave: Condutividade elétrica, contagem de células somáticas, pH, *Staphylococcus* spp.

EVALUATION OF DIAGNOSTIC TESTS FOR SUBCLINICAL MASTITIS IN GOATS IN SOBRAL/CE

GENERAL ABSTRACT

Nowadays there are efficient tests that detect subclinical mastitis in bovine, but, for goats the diagnosis is still controversial to present false positive result, Therefore, it is necessary to evaluate the available tests to infer reliability to the diagnosis of the disease. Monthly samples were collected for six months, of 20 goats of the Saanen (n = 9) and Anglo Nubian (n = 11). The sample were performed individually, per ceiling, totaling 232 milk samples, in which were research of *Staphylococcus* spp., electrical conductivity test, content of chlorides, pH, somatic cell count (SCC) by the method microscopic and electronic. Has been used a completely randomized design and the average compared by test F 5% to race and Tukey 5% to period. Also evaluated the correlation between the variables SCC electronic and SCC microscopic using Pearson's correlation, considered a significance level of 5%. A linear regression model was used to evaluate the concordance between SCC electronic and microscopic. For the sensitivity of diagnostic tests was defined as the proportion of true positives among all sick, and specificity as the proportion of true negatives among all healthy, and the efficiency or accuracy as the proportion of the successes of diagnostic test. Was possible observed a positive correlation between the parameters SCC electronic and SCC microscopic of $r=0,88$ and association of $R^2=0,77$; ($p<0,0001$). The SCC by electronic method overestimated 2,2 times the SCC microscopic. The SCC by microscopic method using the dye pyronin-y methyl green was the most trusted and the methods of SCC analyzed showed high linear crescent correlation each other. The CMT test showed a sensitivity of 61.1% and specificity of 43%, not being recommended for the diagnosis of mastitis. The EC test showed 100% NPV, considered high value, that is, the test was able to identify 100% of truly healthy animals, indicating that it may be recommended screening for subclinical mastitis. The prevalence of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* coagulase-negative was 8%. The results found for the chlorides test showed sensitivity of 88.8% and specificity of 9.3%, the 210 analyzed samples that presented an average higher than 0.221, 194 (92.0%) didn't present microbiological isolation, being therefore not efficient in identifying goats with subclinical mastitis. the pH was higher in samples with bacterial isolation, independent of race.

Key words: Electric conductivity; pH; somatic cell count; *Staphylococcus* spp.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sistema de criação de cabras leiteiras a mastite é considerada um dos principais problemas para o rebanho, pois a doença atinge fêmeas durante toda a lactação, causando prejuízos à saúde do animal, queda na produção e elevação de custos com a utilização de medicamentos.

O diagnóstico precoce da mastite é fundamental para o controle da enfermidade no rebanho. A identificação de animais com mastite clínica é fácil, devido aos sinais clínicos que ocorrem no úbere e alterações macroscópicas no leite secretado, porém, para a mastite subclínica, é necessário a realização de testes diagnósticos capazes de evidenciar as alterações no leite devido a infecção.

Os testes microbiológicos, detecção do teor de cloretos, *California Mastitis Test* (CMT), Contagem de Células Somáticas (CCS), condutividade elétrica e pH estão sendo estudados para verificar a eficiência como métodos diagnósticos da mastite subclínica caprina. Porém, devido algumas peculiaridades da espécie caprina, como, alta taxa de descamação do epitélio glandular, podem interferir na confiabilidade dos resultados de alguns testes, exigindo portanto, cautela nas interpretações.

O uso de testes, em nível de campo, é fundamental para que o produtor, além de obter resultados rápidos, possa tomar decisões como medida de controle para evitar a disseminação e evolução da mastite no rebanho, assim como, garantir que o leite e seus derivados produzidos sejam alimentos seguros aos consumidores e sem riscos a saúde pública.

Diante do exposto, torna-se importante avaliar a validade preditiva dos testes de diagnóstico de mastite subclínica disponíveis, possibilitando ao produtor utilizar métodos rápidos e com resultados confiáveis, tornando o sistema de produção de leite de cabra mais eficiente e com maior rentabilidade.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
BHI	Brain Heart Infusion
BRONOPOL®	2-Bromo-2-Nitropropano-1,3-Diol
CCS	Contagem de Células Somáticas
CE	Condutividade Elétrica
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CS/mL	Células somáticas por mililitro de leite
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECN	Estafilococo coagulase-negativa
ECP	Estafilococo coagulase-positiva
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRVP	Vermelho de Metila Voges-Proskauer
mS	miliSiemens
PYMG	Pyronine Y-Methyl Green
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
UI	Unidade Internacional
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	Página
Tabela 1: Composição físico-química média dos leites de caprino, ovino, bovino e humano (por 100g)	22
Tabela 2: Requisitos físico-químicos do leite de cabra cru refrigerado: segundo a Instrução Normativa nº 37	22
Tabela 3: Contagem de células somáticas como parâmetro de qualidade para o leite de cabra em Israel, 2008	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Possíveis resultados para um teste de diagnóstico	52
Tabela 2: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método microscópico.....	53
Tabela 3: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método eletrônico.....	54
Tabela 4: Contagem de células somáticas pelo método eletrônico e microscópico no leite de cabras de diferentes raças e período de lactação	57
Tabela 5: Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina.....	58

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Possíveis resultados para um teste de diagnóstico	77
Tabela 2: Reação ao <i>California Mastitis Test</i> das metades mamárias de cabras leiteiras de diferentes raças em diferentes períodos de coleta.....	79
Tabela 3: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp., em número absoluto e respectiva porcentagem, encontrados no cultivo microbiológico seletivo no leite avaliado, de acordo com o <i>California Mastitis Test</i>	80
Tabela 4: Teor de cloretos obtidos no leite entre diferentes raças com e sem isolamento microbiológico.....	81
Tabela 5: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. encontrados no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teor de cloretos.....	82
Tabela 6: Teor de cloretos no leite de cabra de diferentes raças e estágio de lactação	82

Tabela 7: Condutividade Elétrica (CE) e pH em leite de cabras Anglo Nubiana e Saanen	83
Tabela 8: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teste de Condutividade Elétrica	84
Tabela 9: Comparação do teste de Condutividade Elétrica e pH entre as raças durante a curva de lactação	85
Tabela 10: Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. encontrados no cultivo microbiológico de leite de cabras de acordo com o pH	86
Tabela 11: Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

	Página
Figura 1: a: Representação da glândula mamária b: alvéolos e c: secreção apócrina	21

CAPÍTULO 2

Figura 1: Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento.....	46
Figura 2: Teste da caneca telada.....	46
Figura 3: Reação positiva ao CMT	47
Figura 4: Referência dos elementos celulares para contagem microscópica de células somáticas presentes no leite: A (Hemácias); B (Linfócito); C (Monócito); D (Eosinófilo); E (Basófilo); F (Neutrófilo – polimorfonucleares)	48
Figura 5: Contagem de células pelo método microscópico: A-lâminas coradas com <i>pyronine Y-methyl green</i> ; B-contagem das células por meio da microscopia óptica; C-células somáticas (azul); D-células de descamação (vermelha)	48
Figura 6: Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp., em meio agar Baird-Parker	50
Figura 7: Teste da catalase em colônias isoladas	50
Figura 8: Teste de coagulase livre em tubo a-Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo	51
Figura 9: Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer	51

CAPÍTULO 3

Figura 1: Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento	70
Figura 2: Teste da caneca telada.....	72
Figura 3: Reação positiva ao CMT.....	72
Figura 4: Teste de cloretos em leite de cabra: a - Titulação da amostra de leite b - coloração alaranjado-escuro após a titulação como indicador de excesso de íons de prata	73
Figura 5: Lactoscan SA para os testes pH e CE.....	74
Figura 6: Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp., em meio agar Baird-Parker	75
Figura 7: Teste da catalase em colônias isoladas.....	75
Figura 8: Teste de coagulase livre em tubo a-Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo	76

Figura 9: Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer.....	76
Figura 10: <i>Staphylococcus</i> spp. Cocos gram-positivo em forma de cachos de uva.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

	Página
Gráfico 1: Regressão linear entre a CCS automática e microscópica	56

RESUMO GERAL

Atualmente existem testes diagnósticos eficientes que detectam a mastite subclínica em bovinos, porém, para caprinos os métodos ainda são controversos por apresentarem resultados falso-positivos, sendo necessário portanto, avaliação dos testes disponíveis para inferir confiabilidade ao diagnóstico da enfermidade. Foram coletadas amostras mensais durante seis meses, de 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11). As coletas foram realizadas individualmente, por teto, totalizando 232 amostras de leite, nas quais foram realizadas pesquisa de *Staphylococcus* spp., teste de condutividade elétrica (CE), pesquisa do teor de cloretos, pH e a contagem de células somáticas (CCS) pelo método microscópico e eletrônico. Usou-se um delineamento inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo Teste F a 5% para raças e Tukey a 5% para o período. Avaliou-se também a correlação entre as variáveis CCS microscópica e CCS eletrônica utilizando a correlação de Pearson, considerando-se um nível de significância de 5%. Um modelo de regressão linear foi usado para avaliar a concordância entre a CCS automática e microscópica. Para sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico. Foi possível observar correlação positiva entre os parâmetros CCS eletrônica e CCS microscópica de $r=0,88$ e associação de $R^2=0,77$ ($p<0,0001$). A CCS pelo método eletrônico superestimou 2,2 vezes a CCS microscópica. A CCS obtida pelo método microscópico utilizando o corante pyronina Y-verde de metila foi a mais confiável e os métodos de CCS analisados apresentam alta correlação linear crescente entre si. O teste CMT não é recomendado para o diagnóstico por apresentar sensibilidade de 61,1% e especificidade de 43%, considerados baixo. A CE acusou 100% dos animais verdadeiramente sadios, indicando que pode ser recomendado como prova de triagem para mastite subclínica. A prevalência de mastite subclínica causada por estafilococos coagulase-negativa foi de 8%. Os resultados encontrados para o teste de cloretos apresentaram sensibilidade de 88,8% e especificidade de 9,3%, das 210 amostras analisadas que apresentaram média superior a 0,221, 194 (92,0%) não apresentaram isolamento microbiológico, não sendo portanto eficiente em identificar cabras com mastite subclínica. O pH foi superior nas amostras com isolamento bacteriano, independente da raça.

Palavras-Chave: Condutividade elétrica, contagem de células somáticas, pH, *Staphylococcus* spp.

EVALUATION OF DIAGNOSTIC TESTS FOR SUBCLINICAL MASTITIS IN GOATS IN SOBRAL/CE

GENERAL ABSTRACT

Nowadays there are efficient tests that detect subclinical mastitis in bovine, but, for goats the diagnosis is still controversial to present false positive result, Therefore, it is necessary to evaluate the available tests to infer reliability to the diagnosis of the disease. Monthly samples were collected for six months, of 20 goats of the Saanen (n = 9) and Anglo Nubian (n = 11). The sample were performed individually, per ceiling, totaling 232 milk samples, in which were research of *Staphylococcus* spp., electrical conductivity test, content of chlorides, pH, somatic cell count (SCC) by the method microscopic and electronic. Has been used a completely randomized design and the average compared by test F 5% to race and Tukey 5% to period. Also evaluated the correlation between the variables SCC electronic and SCC microscopic using Pearson's correlation, considered a significance level of 5%. A linear regression model was used to evaluate the concordance between SCC electronic and microscopic. For the sensitivity of diagnostic tests was defined as the proportion of true positives among all sick, and specificity as the proportion of true negatives among all healthy, and the efficiency or accuracy as the proportion of the successes of diagnostic test. Was possible observed a positive correlation between the parameters SCC electronic and SCC microscopic of $r=0,88$ and association of $R^2=0,77$; ($p<0,0001$). The SCC by electronic method overestimated 2,2 times the SCC microscopic. The SCC by microscopic method using the dye pyronin-y methyl green was the most trusted and the methods of SCC analyzed showed high linear crescent correlation each other. The CMT test showed a sensitivity of 61.1% and specificity of 43%, not being recommended for the diagnosis of mastitis. The EC test showed 100% NPV, considered high value, that is, the test was able to identify 100% of truly healthy animals, indicating that it may be recommended screening for subclinical mastitis. The prevalence of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* coagulase-negative was 8%. The results found for the chlorides test showed sensitivity of 88.8% and specificity of 9.3%, the 210 analyzed samples that presented an average higher than 0.221, 194 (92.0%) didn't present microbiological isolation, being therefore not efficient in identifying goats with subclinical mastitis. the pH was higher in samples with bacterial isolation, independent of race.

Key words: Electric conductivity; pH; somatic cell count; *Staphylococcus* spp.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sistema de criação de cabras leiteiras a mastite é considerada um dos principais problemas para o rebanho, pois a doença atinge fêmeas durante toda a lactação, causando prejuízos à saúde do animal, queda na produção e elevação de custos com a utilização de medicamentos.

O diagnóstico precoce da mastite é fundamental para o controle da enfermidade no rebanho. A identificação de animais com mastite clínica é fácil, devido aos sinais clínicos que ocorrem no úbere e alterações macroscópicas no leite secretado, porém, para a mastite subclínica, é necessário a realização de testes diagnósticos capazes de evidenciar as alterações no leite devido a infecção.

Os testes microbiológicos, detecção do teor de cloretos, *California Mastitis Test* (CMT), Contagem de Células Somáticas (CCS), condutividade elétrica e pH estão sendo estudados para verificar a eficiência como métodos diagnósticos da mastite subclínica caprina. Porém, devido algumas peculiaridades da espécie caprina, como, alta taxa de descamação do epitélio glandular, podem interferir na confiabilidade dos resultados de alguns testes, exigindo portanto, cautela nas interpretações.

O uso de testes, em nível de campo, é fundamental para que o produtor, além de obter resultados rápidos, possa tomar decisões como medida de controle para evitar a disseminação e evolução da mastite no rebanho, assim como, garantir que o leite e seus derivados produzidos sejam alimentos seguros aos consumidores e sem riscos a saúde pública.

Diante do exposto, torna-se importante avaliar a validade preditiva dos testes de diagnóstico de mastite subclínica disponíveis, possibilitando ao produtor utilizar métodos rápidos e com resultados confiáveis, tornando o sistema de produção de leite de cabra mais eficiente e com maior rentabilidade.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
BHI	Brain Heart Infusion
BRONOPOL [®]	2-Bromo-2-Nitropropano-1,3-Diol
CCS	Contagem de Células Somáticas
CE	Condutividade Elétrica
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CS/mL	Células somáticas por mililitro de leite
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECN	Estafilococo coagulase-negativa
ECP	Estafilococo coagulase-positiva
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRVP	Vermelho de Metila Voges-Proskauer
mS	miliSiemens
PYMG	Pyronine Y-Methyl Green
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
UI	Unidade Internacional
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes são conhecidos por sua adaptabilidade às regiões semiáridas brasileiras, que apresentam características de longos períodos de escassez de água e alimento. Estima-se que o Brasil possua aproximadamente 8.851.879 milhões de cabeças de caprinos e que o Nordeste detenha 91,61% de todo o rebanho nacional, tornando-se visível a influência da atividade para o desenvolvimento da região (IBGE, 2014).

Por muito tempo a criação de pequenos ruminantes foi vista como sistema secundário para obtenção de renda e, muitas vezes, apenas para subsistência das pequenas famílias. Porém, a atividade pode garantir a segurança alimentar e geração de emprego para as famílias no campo (CORREIA, 2013).

Apesar das dificuldades impostas aos pequenos produtores, como a deficiência de assistência técnica, pouco capital financeiro e carência de recursos tecnológicos a criação de caprinos leiteiros, quando bem manejados, podem apresentar bons índices zootécnicos e econômicos.

No Brasil muitos produtores ainda criam os animais extensivamente comprometendo o desempenho produtivo. Para Silva et al. (2013), a caprinocultura leiteira vem sofrendo mudanças em seu sistema tradicional de manejo devido ao aumento da população no meio rural e redução no tamanho das propriedades, alterando a estrutura no sistema de produção. A adoção do manejo nutricional, sanitário e inserção de raças especializadas são alternativas que podem melhorar o desempenho dos animais e aumentar a produtividade.

A qualidade do leite está diretamente relacionada a saúde, alimentação e manejo dos animais, incluindo os cuidados durante a ordenha, manuseio dos utensílios e transporte adequado da fazenda até as indústrias processadoras de laticínios, (LANGONI et al., 2012). Na caprinocultura leiteira a mastite é considerada uma das mais importantes enfermidades, pois afeta a qualidade do leite, diminui a produtividade, eleva os custos de produção e descarte precoce de fêmeas.

A etiologia da mastite é complexa e multivariada (tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa), sendo a identificação do agente etiológico causador da infecção fundamental para a prevenção, controle e monitoramento do rebanho. O *Saphylococcus aureus* é o agente mais relevante em estudos por estar envolvido em casos de saúde pública por produzir toxinas termoestáveis que permanecem no leite, mesmo

após tratamento térmico por calor, favorecendo a ocorrência de intoxicação, caracterizada clinicamente por náuseas, mal-estar, debilidade geral, diarreia, cefaleia e dor abdominal (MURRAY et al., 1992).

A ocorrência da doença no rebanho está interligada a vários fatores, podendo ser inerente aos animais: idade, espécie, estágio da lactação, resistência natural e hereditariedade assim como fatores ambientais: infectividade e patogenicidade do agente etiológico, ordenha, manejo, clima e nutrição (PEIXOTO et al., 2011).

A frequência da mastite subclínica em rebanhos leiteiros pode oscilar entre 22 a 75% e atinge entre 10 a 68% das metades da glândula mamária (LIMA JÚNIOR et al., 1994). A doença é causada por micro-organismos patogênicos, geralmente por bactérias, que afetam a glândula mamária causando alterações na composição físico-química do leite e aumento nas taxas de células somáticas (SILVA e SILVA, 1987).

Atualmente o *California Mastitis Test* (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS) são comprovadamente eficientes em detectar a mastite subclínica em bovinos, porém, devido a fisiologia diferenciada de secreção de leite na espécie caprina, os testes que se baseiam no conteúdo celular presente no leite podem apresentar resultados controversos, indicando presença de infecção mesmo quando ela não existe.

Tendo em vista a escassez de informação para o diagnóstico da mastite subclínica caprina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a validade preditiva dos testes *California Mastitis Test* (CMT), teor de cloretos, condutividade elétrica (CE), pH, Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo método eletrônico e manual para o diagnóstico da enfermidade.

1 Glândula mamária

A glândula mamária é um tecido especializado que sintetiza leite a partir de nutrientes presentes na corrente sanguínea. A secreção do leite é feita por células epiteliais que formam uma estrutura arredondada chamada alvéolos que por sua vez é coberto por células contráteis de natureza mioepitelial que respondem aos estímulos de ejeção do leite (PRATA e FUKUDA, 2001).

Devido ao processo fisiológico de secreção do leite em caprinos ser apócrina a quantidade de células proveniente da descamação fisiológica e partículas citoplasmáticas oriundas do processo de secreção láctea é maior quando comparado aos bovinos (Figura 1). Durante a secreção do leite ocorre a separação da base distal das células epiteliais alveolares, sendo eliminada no lúmen na forma de partículas citoplasmáticas, preenchidas

por glóbulos de gordura, com tamanho de 5-30mm (DULIN et al., 1983; PERRIN e BAUDRY, 1993). Essas células possuem estruturas, diâmetro e morfologia semelhantes a leucócitos e contêm grande quantidade de proteína e RNA, porém nenhum DNA (DULIN et al., 1982) e correspondem até 35% dos elementos celulares observados no leite de cabras (SIERRA et al., 1999).

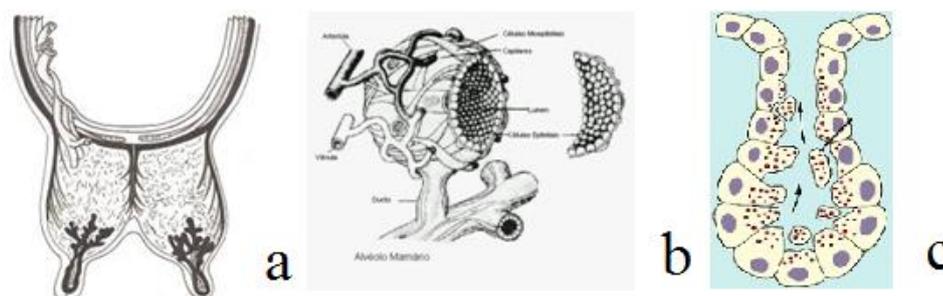


Figura 1. a: Representação da glândula mamária b: alvéolos e c: secreção apócrina.
Fonte: MORAES, 2016.

2 Composição do leite de cabra

O leite de cabra apresenta em sua composição compostos importantes para nutrição humana. Segundo Pellegrini et al. (2011), as proteínas são consideradas de alto valor biológico e os ácidos graxos possuem cadeias de tamanho curta a média, tornando-o de fácil digestibilidade e hipoalergênico, podendo ser consumido por crianças, adultos e idosos.

O leite de cabra apresenta em sua composição proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas que classificam o alimento de excelente valor nutricional, podendo sofrer alterações nas características quantitativas e qualitativas através da alimentação dos animais (MORAND-FEHR et al., 2007).

A composição físico-química do leite pode variar em decorrência de diversos fatores, tais como: idade do animal, estágio de lactação, curva de lactação, nutrição, raça, condições climáticas em que o animal está inserido, assim como os animais de diferentes espécies (Tabela 1). Os nutrientes que mais sofrem alterações são as gorduras e proteínas (WALSTRA et al., 1987).

Tabela 1. Composição físico-química média dos leites de caprino, ovino, bovino e humano (por 100g)

Componentes	Tipos de leite			
	Caprinos	Ovinos	Bovinos	Humanos
Água (%)	87,5	ND	87,2	87,1
Energia (Cal)	67,0	107,0	66,0	70,0
Gordura (%)	3,8	7,6	3,7	4,0
Sólidos desengordurados (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Cinzas total (%)	0,86	0,9	0,71	0,3
Ca (%)	0,19	0,16	0,18	0,64
P (%)	0,27	0,14	0,23	0,06
Cl (%)	0,15	0,27	0,1	0,06
Vitamina A (UI/g de gordura)	39	25	21	32
Vitamina B1 (mg/100 mL)	68	7	45	17
Vitamina B12 (mg/100 mL)	210	36	159	26
Vitamina C (mg/100 mL)	20	43	2	3,6
Vitamina D (UI/g de gordura)	0,7	ND	0,7	0,27

Adaptado de: Ribeiro (1997); Park et al. (2007); Almeida (2009); Belanger (1990); Mahaut et al. (2000); Coelho (2012).

ND: não definido UI: unidade internacional

A Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000) objetivando regulamentar os padrões técnicos de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, estabeleceu os requisitos mínimos dos componentes físico-químicos para o leite de cabra (Tabela 2).

Tabela 2. Requisitos físico-químicos do leite de cabra cru refrigerado: segundo a Instrução Normativa nº 37

Requisitos	Integral	Semi-desnatado	Desnatado
Gordura	Teor original	2,9 – 0,6%	Máximo 0,5%
Proteína	Mínimo 2,80% para todas as variedades		
Lactose	Mínimo 4,30% para todas as variedades		
Sólidos desengordurados	Mínimo 8,20% para todas as variedades		
Cinzas	Mínimo 0,70% para todas as variedades		

(BRASIL, 2000).

Os ácidos graxos de maior relevância contidos no leite de cabra são os palmíticos (C16:0), esteáricos (C18:0) e cápricos (C10:0). Para os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), o mais abundante é o oleico (VILANOVA et al., 2012).

3 Mastite

A mastite caprina é uma doença infecciosa causada por micro-organismo patogênico que afeta a glândula mamária causando danos à saúde dos animais, decréscimo na produção e alterações na composição físico-química do leite, sendo sua

manifestação predominantemente subclínica. A contaminação pode ocorrer durante a ordenha (manual ou mecânica) realizada sem higiene adequada ou pelo contato do úbere no solo contaminado (SILVA e SILVA, 1987).

A doença pode ser classificada de acordo com o agente etiológico, em ambiental ou contagiosa. Segundo Fonseca e Santos (2000), a mastite ambiental é causada por micro-organismo existente no meio ambiente, como a *Escherichia coli*, enquanto que a mastite contagiosa é causada por patógenos que estão presentes, de preferência, no interior da glândula mamária e na superfície da pele, sendo os principais agentes etiológicos os *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

A classificação da mastite pode ser dada também de acordo com grau de infecção, em clínica e subclínica. A clínica é caracterizada por apresentar sintomas visíveis no úbere do animal como edema, dor, rubor e aumento da temperatura e alterações no leite, como, presença de grumos, pus, sangue e alteração na cor (COSTA, 1998). Já para a mastite subclínica, só é possível ser detectada por meio de testes laboratoriais.

A mastite clínica em pequenos ruminantes geralmente ocorre em menos de 5% do rebanho, enquanto que para a mastite subclínica a incidência pode ser de 5 a 30% (CONTRERAS et al., 2007).

A mastite, segundo Peixoto et al. (2010b), pode ser causada por fatores de riscos inerentes ao animal: idade e número de lactação, curva de lactação, características físicas do úbere e tetos, higiene do úbere e estado nutricional e também inerente ao ambiente: manejo dos animais, qualidade das instalações, técnicas de ordenha e estação do ano.

A mastite clínica caprina é causada principalmente por *Staphylococcus aureus* e em casos subclínico da doença, por estafilococos coagulase-negativos (ECN) (FASULKOV et al., 2015). A maior prevalência e patogenicidade na forma subclínica, segundo Almeida et al. (2013), geralmente está relacionada aos agentes etiológicos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Os principais agentes etiológicos causadores da mastite nos pequenos ruminantes são as bactérias dos gêneros: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Mannheimia haemolytica*. A mastite também pode ocorrer por algumas espécies de fungos, porém, é menos frequente (BERGONIER e BERTHELOT, 2003; GONZALO et al., 2004; CONTRERAS et al., 2007; PEIXOTO et al., 2010a).

Dentre as espécies de ECN as mais comumente isoladas em leite de cabra são: *S. epidermididis*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* (CONTRERAS et al., 1997).

Em estudo conduzido por Salaberry et al. (2015), utilizando placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%), das 226 amostras de leite proveniente de sete propriedades de caprinos leiteiros, 122 amostras apresentaram multiplicação bacteriana, e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) coagulase-negativa e 20 (16,4%) coagulase-positiva, nove (7,4%) *Corynebacterium* spp. e três (2,5%) *Streptococcus* spp.

De acordo com Cavalcante et al. (2013), ao avaliarem 218 fêmeas em lactação reportaram que a maioria das infecções intramamárias foram causadas por um único agente (93,8%), com exceção de três casos (6,2%) onde havia infecção mista em uma fêmea por *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus epidermidis* na mesma glândula e as outras duas apresentavam infecção por *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *S. epidermidis* e leveduras, porém um único tipo de patógeno em cada glândula.

Cavalcante et al. (2013), ao analisarem 61 amostras de leite, observaram maior prevalência para *Staphylococcus* spp. (90,3%), sendo o *S. aureus* (29,5%) o agente mais isolado, seguido de *S. intermedius* (26,2%), *S. epidermidis* (21,3%) e outros ECN (14,7%). Também foram isolados *Streptococcus* spp. (4,9%), *Micrococcus* spp. (1,7%) e *Enterobacter* spp. (1,7%).

Contreras et al. (2007), relataram que infecções intramamárias causadas por *S. aureus* necessitam de maior atenção por causarem danos à saúde dos animais e prejuízo na produção, serem resistentes aos antibióticos, possuírem alta patogenicidade e apresentar implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que produzem toxinas que podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos destinados aos consumidores, caracterizando quadros de intoxicação alimentar (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

4 Métodos de diagnóstico da mastite subclínica caprina

4.1 Avaliação microbiológica

Vários agentes etiológicos podem atuar durante o processo inflamatório da glândula mamária, tornando a mastite complexa e multivariada. A identificação dos micro-organismos por meio de cultura é fundamental para o controle, prevenção e monitoramento do rebanho pois facilita a adoção de medidas diferenciadas de controle (BRITO e BRITO, 1999).

Do ponto de vista epidemiológico, é de grande importância a determinação da origem dos micro-organismos envolvidos na etiologia da mastite. Nesse contexto, a

caracterização exata dos patógenos se faz imprescindível para a detecção das vias de transmissão e fontes de infecção, além de permitir o monitoramento da disseminação de estirpes bacterianas entre populações animais (LANGE et al., 1999).

As metodologias para o diagnóstico bacteriológico se padronizaram, facilitando o isolamento e identificação dos patógenos do úbere por meio de cultura de amostras coletadas assepticamente, se tornando um dos testes mais utilizados para o diagnóstico da mastite (BRITO e BRITO, 1999).

A avaliação microbiológica é considerada “padrão-ouro” por ser o melhor teste para o diagnóstico da mastite subclínica caprina, pois vários agentes etiológicos podem causar a doença e a presença de micro-organismos no leite é um indicativo de infecção intramamária (CONTRERAS et al., 2007).

4.2 *California Mastitis Test* (CMT)

A reação do *California Mastitis Test* (CMT) se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel, cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas.

O teste CMT é utilizado pelos produtores como método indireto de diagnóstico da mastite subclínica bovina, porém para caprinos o teste é duvidoso devido a presença de células epiteliais que reagem juntamente com os leucócitos (BARCELLOS et al. 1987; LANGONI, DOMINGUES e BALDINI, 2006).

Em caprinos, o CMT negativo é um bom indicador da inexistência de infecções, porém, quando a reação é positiva, não necessariamente o animal estará com processo infeccioso, uma vez que o leite de cabra contém maior quantidade de células de descamação que podem reagir ao CMT, levando a interpretação da prova diferente da realidade (LEWTER et al., 1984).

Uma média de 3% dos corpúsculos citoplasmáticos pode conter fragmentos de núcleo (PAAPE e CAPUCO, 1997), que juntamente com as células epiteliais pode elevar a concentração de leucócitos presentes no leite, mesmo em animais sadios. Já os corpúsculos citoplasmáticos, que não possuem núcleo, não reagem ao CMT, consequentemente, não interferem nos resultados (PETTERSEN, 1981).

O reagente CMT é um detergente aniônico neutro com indicador de pH que, quando se mistura ao leite, em partes iguais, rompe a membrana das células de defesa (leucócitos) e reage com o material nucleico (DNA) alterando sua viscosidade (LANGONI, 2007).

De acordo com a intensidade da reação pode ser classificado em Negativo (-): sem formação de gel; Positivo: (+) = com leve formação de gel; Positivo: (++) = com formação de gel espesso bem definido; Positivo: (+++) = gel bastante espesso, assentando no fundo da bandeja (SCHALM e NOORLANDER, 1957). Mesmo que o teste para o CMT seja negativo recomenda-se que seja realizado análises microbiológicas para confirmar o diagnóstico (SOUZA et al., 2015).

Schalm et al. (1957), estudando a interpretação da reação CMT utilizando leite de cabra, verificaram que cabras sem mastite podem apresentar reações traços ou (+), porém, (++) e (+++) podem ser importantes indicativos de infecções intramamárias. Já Pettersen (1981) demonstrou que o limite para o teste CMT deve ser em torno de (++) para indicar infecção intramamária em cabras.

O escore (++) para o teste CMT indicou melhor conjunto de sensibilidade (70,58%) e especificidade (75,0%), portanto, esse nível foi escolhido como o melhor método de triagem para mastite subclínica em cabras (SANTOS et al., 1995).

Em pesquisa conduzida por Neves et al. (2010), utilizando 261 amostras de leite de cabra, reportaram que 105 amostras apresentaram reação positiva ao CMT, destas, 14 amostras foram positivas ao exame microbiológico, enquanto que 156 amostras negativas ao CMT, 16 foram positivas ao exame microbiológico. Considerando o exame bacteriológico como “padrão-ouro”, o CMT apresentou baixa sensibilidade (46,7%) e baixa especificidade (60,6%), constatando que o teste apresenta elevado número de falsos positivos, não sendo portanto, um método confiável para o diagnóstico da mastite subclínica em cabras.

Segundo Fox et al. (1992), para que se tenha um diagnóstico definitivo de mastite subclínica, o resultado do CMT deve ser associado ao exame microbiológico.

4.3 Detecção do teor de cloretos

Durante o processo inflamatório da glândula mamária ocorre a destruição das junções celulares e do sistema bomba ativa, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos e permitindo que a taxa de passagem de íons de cloretos presentes no sangue seja maior que o normal, ocasionando mudanças na composição físico-química do leite (WEGNER e STUUL, 1978; DELLA LIBERA et al., 2011). Os principais componentes que sofrem influência são: gordura, proteína, lactose, minerais e enzimas, assim como aumento dos cloretos, sódio e imunoglobulinas que podem ser utilizados por meio de testes para o diagnóstico da mastite subclínica em caprinos (STEFFERT, 1993).

Por meio de testes sensíveis aos íons de cloreto é possível detectar os animais que apresentam mastite subclínica, uma vez que a presença de cloretos no leite está associada ao quadro de infecção intramamária. O teor de cloretos pode variar em decorrência da curva de lactação, apresentado geralmente valores elevados no início e final da lactação em bovinos. O valor encontrado para o teor de cloretos para vacas sadias e infectadas é de 0,137 g/100 mL e 0,192 g/100 mL, respectivamente (AMARAL et al., 1988).

Quando a presença de cloreto de sódio está acima de 0,2% é um indicativo de mastite subclínica em cabras (BARCELLOS, SILVA e MARQUES JÚNIOR, 1987).

O teor de cloretos no leite de cabra, segundo Lima Júnior et al. (1994), é maior quando comparado ao leite de vaca mesmo quando os animais apresentam CMT negativo. Tonin et al. (2002), observaram que o teor de cloretos variou durante os estágios de lactação em cabras ordenhadas uma vez ao dia, encontrando valores médios no período inicial, médio e final de 0,179 g/100 mL, 0,201 g/100 mL e 0,216 g/100 mL, respectivamente. Almeida et al. (2013) analisando o teor de cloretos em leite de cabras de 11 propriedades dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro observaram valores médio de 0,197 g/100 mL e 0,370 g/100 mL respectivamente em cada estado.

4.4 Condutividade Elétrica (CE) e pH

As medições da Condutividade Elétrica (CE) no leite tem sido utilizadas como uma ferramenta para identificar animais que apresentam mastite subclínica e início de mastite clínica, e tem como vantagem a automatização da sala de ordenha, oferecendo resultados rápidos que contribuem na melhoria da segurança e qualidade do leite (DIAZ et al., 2012).

A CE mede a capacidade de uma solução em conduzir uma corrente elétrica entre dois eletrodos, sendo mensurada em miliSiemens (mS). Os ânions (Cl^-) e cátions (Na^+ , e K^+) são os mais relevantes para determinação (NORBERG, 2004). O leite de vaca normal deve apresentar valores entre 4,0 a 5,5 mS/cm a 25°C (WONG, 1988) enquanto que o leite de cabra pode variar entre 4,9 a 13,9 mS/cm a 25°C (LE MENS, 1991).

Com o aumento da concentração dos íons de Na^+ e Cl^- e redução de K^+ na composição do leite devido à infecção da glândula mamária e destruição dos sistemas de bombeamento iônico o teste de CE tem sido estudado para identificar animais com mastite subclínica. Pesquisas mostram que a CE tem apresentado correlação positiva entre a quantidade de CCS e ao teste CMT (FOSGATE et al., 2013).

Segundo Hillerton e Walton (1991), o teste de CE apresenta-se eficiente em identificar os animais com mastite subclínica quando causada por *Staphylococcus aureus*, porém, ineficiente quando causada por *Streptococcus uberis*. Segundo Zaninelli et al. (2015) o teste de CE pode apresentar sensibilidade e especificidade de até 81% e 73% respectivamente.

Segundo os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, para o leite de cabra fresco admite-se reação ligeiramente ácida, variando entre 6,6 a 6,8, com acidez titulável, expressa em % de ácido láctico em torno de 0,13 a 0,18 °Dornic (BRASIL, 2000).

Fatores como alimentação, clima, raça e período de lactação podem afetar a composição físico-química e a acidez do leite de cabra. Trabalho realizado por Queiroga et al. (2007), em Bananeiras, Microrregião do Brejo Paraibano, utilizando 20 cabras da raça Saanen, verificaram que a acidez do leite sofreu variação durante as fases de lactação, ocorrendo elevação do pH aos 135 dias, sendo necessário levar em consideração na interpretação do teste.

Com a infecção intramamária por micro-organismos patogênicos a permeabilidade dos vasos sanguíneos é alterada permitindo que íons, principalmente de cloretos, atravessem e se depositem no leite, fazendo com que ocorra a elevação do pH. Quando os valores estão próximos de 7 (sete), leite típico alcalino, é considerado como indicativo de mastite subclínica (CALLEFE e LANGONI, 2015).

4.5 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Os métodos de diagnóstico para mastite subclínica em bovinos que se baseiam no aumento das células somáticas são confiáveis e utilizados como teste padrão pela legislação. Porém, para caprinos os testes baseados em Contagem de Células Somáticas (CCS) podem indicar presença da doença mesmo quando os animais estão saudáveis, comprometendo a confiabilidade dos resultados, uma vez que os caprinos podem fisiologicamente apresentar maior quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas no leite, mesmo não estando relacionado necessariamente à infecção (LANGONI et al., 2012).

As células de defesa provenientes da corrente sanguínea como leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células epiteliais provenientes da descamação formam um conjunto de células somáticas que são utilizadas como indicadores da saúde da glândula mamária e qualidade do leite. O aumento destas células

no leite está associado à infecção intramamária (LERONDELLE et al., 1992; ZENG et al., 1997; SANCHEZ et al., 1999).

Durante a secreção de leite pelas células apócrinas ocorre o desprendimento de corpúsculos anucleados resultantes da descamação do epitélio de revestimento dos alvéolos, porém, algumas células com núcleo também podem se desprender e se depositarem no leite (CONTRERAS et al., 1997).

Segundo Dulin et al. (1982), a quantidade de células de descamação aumenta durante o declínio da curva de lactação, por possuir diâmetro e morfologia semelhantes aos leucócitos, grande quantidade de proteína e RNA, mas nenhum DNA. A ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 CS/mL não é raro de ser encontrado, mesmo na ausência de infecções intramamárias (ZENG e ESCOBAR, 1996). A CCS no leite em vacas saudáveis geralmente é inferior a 200.000 CS/mL de leite (National Mastitis Council, 1996), enquanto que em cabras sem infecções intramamárias é inferior a 400.000 CS/mL (McDOUGALL et al., 2001).

A presença de CCS está relacionada ao grau de infecção intramamária e mudanças nas características quantitativas e qualitativas do leite. Devido aos danos no tecido secretor, a síntese de nutrientes é alterada, diminuindo a produção e alterando a composição físico-química, enquanto que o aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos eleva a presença de outros componentes (PEREIRA et al., 1999).

A literatura ainda apresenta resultados questionáveis quanto ao efeito da mastite sobre a concentração de gordura no leite. Em um estudo realizado por Pereira et al. (1999), no laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Zoologia da ESALQ-USP, utilizando 6.112 amostras de leite, verificaram correlação positiva entre CCS e a concentração de gordura e proteína.

Atualmente a Instrução Normativa nº 37 de 31/10/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) específica sobre leite de cabra no Brasil não estabelece limites para a CCS (Brasil, 2000). Porém, em vários países a quantidade máxima permitida varia de acordo com a legislação regente no país de comercialização. Nos Estados Unidos da América o limite é de 750.000 CS/mL, no Canadá é de 500.000 CS/mL e países como a Nova Zelândia, Austrália e União Europeia adotam o limite de 400.000 CS/mL (GODKIN, 2000).

LEITNER et al. (2008) avaliaram as perdas de rendimento de leite de cabras e ovelhas com infecção intramamária e sua relação com a CCS e observaram que a CCS influencia diretamente na qualidade do leite (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem de células somáticas como parâmetro de qualidade para o leite de cabra em Israel, 2008

CS/mL	Qualidade do Leite	Associação com infecção
<800.000	Alta	±25%
<1.500.000	Média	Entre 25 e 50%
>1.500.000	Baixa	Acima de 50%

Fonte: Leitner et al. (2008).

A determinação da CCS pode ser realizada pelo método manual (microscopia direta) ou eletrônico. O método manual consiste em corar o DNA das células somáticas utilizando corantes específicos para cada tipo de leite, se caracterizando por ser um processo demorado, oneroso e sujeito a erros, e a eletrônica que se baseia na contagem do DNA das células coradas por produtos químicos e irradiado com raio laser (RICHTER et al., 2013).

Existem vários corantes para CCS para pequenos ruminantes como o Wright, hematoxilina-eosina, “orange acridine”, azul de tripan, pironina-Y verde de metil (PYMG) e Levowitz-Weber, mas devido a grande presença de corpúsculos citoplasmáticos oriundos da síntese de leite na espécie caprina, o corante mais específico é o PYMG (ZENG et al., 1999). A coloração de Rosenfeld descrita por ROSENFELD (1947) não permite a diferenciação entre as células somáticas e os corpúsculos citoplasmáticos, identificando erroneamente como células mononucleadas apresentando maior número de células quando comparado ao corante PYMG (GOMES et al., 2010).

Alguns equipamentos requerem a utilização do corante fluorescente brometo de etídio para corar os DNAs das células permitindo que os núcleos corados emitam, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um fator multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (CECALAIT, 1993).

Arcuri et al. (2004) avaliando 86 cabras das raças Saanen e Toggenburg observaram que a contagem eletrônica de células somáticas efetuada no equipamento Somacount 300[®], calibrado com leite de vaca é apropriado para leituras de CCS de leite de cabras dentro dos limites considerados no estudo de 24.000 a 2.549.000 CS/mL. Enquanto Machado (2013), utilizando 257 cabras em lactação de 10 propriedades nas cidades de São José do Rio Preto, São Carlos, Limeira, Guaratinguetá, Pirassununga, Botucatu e Jaboticabal, baseando-se na mesma metodologia adotada por Arcuri et al. (2004), observou que a CCS eletrônica superestimou em até 2,1 vezes a CCS microscópica.

Em estudo realizado por Barrón-Bravo et al. (2013), utilizando dados entre os períodos de 2003 a 2010 de 12 fazendas de cabras leiteiras, com sete raças diferentes, totalizando 2202 lactações, em uma escala em que 0,2 a 9,6 correspondem aos valores de CCS de 14.000 a 9.700.000 CS/mL, observaram que a média geral para CCS no estudo foi de 5,05 (cerca de 414.000 CS/mL) e concluíram que as cabras que menos produziram leite (0,2-2,5Kg) apresentaram elevada concentração de CCS (5,28), enquanto que animais de maior produção ($\geq 4,1$ Kg) os valores foram mais baixos (4,72).

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

Avaliar a validade preditiva dos testes disponíveis para o diagnóstico da mastite subclínica caprina.

5.2 Objetivos específicos

1. Comparar a contagem de células somáticas das amostras de leite das fêmeas em lactação, obtidas pelo método eletrônico em equipamento calibrado com padrão de leite bovino, em relação à contagem microscópica direta;
2. Avaliar as características celulares das amostras de leite das fêmeas em lactação, por meio da realização da prova do California Mastitis Test (CMT), determinação da condutividade elétrica do leite, detecção do teor de cloretos, pH e Contagem de Células Somáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCURI, E. F. et al. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p.1497-1500, 2004.
- ALMEIDA, J. F. et al. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.13-18, 2013.
- ALMEIDA, J.F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físicoquímicos na qualidade do leite de cabra in natura**. Tese de Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Niterói: Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense, 2009.
- AMARAL, et al. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. **Ars Veterinária**, v.4, n.1, p.105-112, 1988.
- BARCELLOS, T. F. S., SILVA, N., MARQUES JÚNIOR, A. P. mastite caprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte – Minas Gerais. I – Etiologia e sensibilidade a antibióticos, II – Métodos de diagnóstico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.1, p. 307-315, 1987.
- BARRÓN-BRAVO, O. G. et al. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2-3, p.421-431, 2013.
- BELANGER, J. Criação de Cabras. (4ª edição). Mem-Martins: Publicações Europa – América, 1990.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Production Science**, v.79, p. 1-16, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 nov. 2000. Seção 1, p.23.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).
- CALLEFE, J. L. R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. **Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 22, p.151-162, 2015.
- CARNEIRO, W. P. et al. Utilização de Carboidratos não Fibrosos na Alimentação de Cabras Leiteiras: Composição e Perfil Lipídico. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 17, n. 1, p.50-60, 2015.

CAVALCANTE, M. P. et al. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.19-26, 2013.

CECALAIT (Centre D'études et de Contrôles des Analyses en Industrie Laitière) **La lettre** de CECALAIT, n.7, 1993.

CORREIA, B. R. et al. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.3, p.345-352, 2013.

CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.2815-2819, 1997.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, n.1, p.145-153, 2007.

COELHO, M. O. L. C. **Variabilidade das características do leite de cabra e sua influência no fabrico de queijo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. p. 76, 2012.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do Crmv-sp**, v. 1, n. 1, p.03-09, 1998.

DELLA LIBERA, A.M.M.P. et al. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.297-300, 2011.

DIAZ, J.R. et al. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p.718-726, 2012.

DULIN, A.M., PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v.45, n.5, p.435-439, 1982.

DULIN A.M. et al. Effect of parity stage of lactation, and intramammary infection. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n.11, p.2426-2433, 1983.

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

FASULKOV, I. et al. Ultrasound and histopathological investigations of experimentally induced *Estafilococos aureus* mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 129, n. 1, p.114-120, 2015.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 175, 2000.

- FOSGATE, G.T. et al. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 1, p.98-102, 2013.
- FOX, L. K., HANCOCK, D. D., HORNER, S. D. Selective intramammary antibiotic therapy during the nonlactating period in goats. **Small Ruminant Research**, v.9, n.3, p. 313-318, 1992.
- GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: O papel da CCS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. v.2, p.9-16.
- GOMES, V. et al. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça lacaune, utilizando como corantes o rosenfeld e verde de metil e pironina-y. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p.162-167, 2010.
- GONZALO, C. et al. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**. v.71, p33-38, 2004.
- HILLERTON, J.E.; WALTON, A.W. Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. **Veterinary Record**,v.128, n.1, p.513-515, 1991.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal de 2014**. Disponível em: http://ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default_xls_brasil.shtm. Acesso em: 16/06/2016.
- LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.67, n.2, p.127-141, 1999.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p.51-54, 2006.
- LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: Encontro de pesquisadores em mastites, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 8-17, 2007.
- LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.1, p.115-122, 2012.
- LEITNER, G. et al. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1-3, p.221-225, 2008.
- LERONDELLE, C.; RICHARD, Y.; ISSARTIAL, J. Factores affecting somatic cell counts in goats milk. **Small Ruminant Research**, v.8, n. 1-2, p.129-139, 1992.

LE MENS, P. Propriedades físico-químicas, nutricionais e químicas. In: LUQUET, F.M.; KEILLING, J.; WILDE, R. **Leche y Productos lácteos: vaca, oveja y cabra**. Zaragoza: Acribia, p.343-359, 1991.

LEWTER, M.M. et al. Mastitis in goat. **Compendium of Continuing Education in Veterinary**, v.6, n.7, p.417-425, 1984.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A. Estudo comparativo entre algumas características físico-químicas, celulares e bacteriológicas de leite de cabras reagentes e negativas ao *California Mastitis Tests*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 46, n. 3, p. 290-300, 1994.

McDOUGALL, S. et al. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 3, p. 245-254, 2001.

MACHADO, G. P. **Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscopia (Prescott e Breed, 1 91 0) do leite caprino mastítico**. 2013. 217 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MAHAUT, M., JEANTET, R., BRULÉ, G. **Initiation à la technologie fromagère**. Paris: Editions Technique & Documentation, 2000. 194 p.

MORAND-FEHR, P.; SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D. Influence of extruded soybeans with or without bicarbonate on milk performance and fatty acid composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p.757-765, 2005.

MORAES, I.A. **Fisiologia da glândula mamária**. Disponível em: <<http://www.uff.br/fisiovet/lactacao.pdf>>. 2016. Acesso em: 24/11/2016.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. **Microbiologia Médica**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 513p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison : National Mastitis Council, 1996. 64p.

NEVES, P. B. et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p.379-384,2010.

NORBERG, E. et al. Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. **Journal Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 1099-1107, 2004.

PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal of Animal Science**, v.75, n.2, p.556-565, 1997.

- PARK, Y.W. et al. Characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, n. 1, p.88-113 2007.
- PEIXOTO, R. M. et al. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p.735-740. 2010a.
- PEIXOTO, R. M. et al. Fatores de Risco para Mastite Subclínica em Cabras Leiteiras Criadas no Estado da Bahia. **Revista Científica de Produção Animal**, v.13, n.1, p.135-140, 2011.
- PEIXOTO, R. M. et al. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.9, p.754-762, 2010b.
- PERRIN, G.G.; BAUDRY, C. Numérations cellulaires du lait de chevre. **Le lait**, v.73, n.5/6, p.489-497, 1993.
- PETTERSEN, K-E. Cell content in goat's milk. **Acta Veterinary Scandinavia**, v. 22, n. 2, p. 226-237, 1981.
- PEREIRA, A. R. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 36, n. 3, p.121-124, 1999.
- PELLEGRINI, L.G. et al. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e Ovino. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v.7, n.1, 2012.
- PRATA, L. F.; FUKUDA, R. T. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal: Funep, 2001. 287 p.
- QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p.430-437, 2007.
- RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, p.180-189. 1997.
- RICHTER, E. et al. Ações de manejo e sanitárias no controle de CCS em rebanhos leiteiros agroecológicos. **Cadernos de Agroecologia**, v.8, n.2, p.1-4, 2013.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.
- SALABERRY S. R. S. et al. Contagem de células somáticas e viabilidade celular em cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.. **Veterinária e Zootecnia**, v.22, n.3, p. 445-454, 2015.

- SANCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C. Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. **Small Ruminant Research**, v.31, n.3, p.197-201, 1999.
- SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n.1 p.1 1 4-1 25, 2007.
- SANTOS, L. F. L.; CASTRO, R. S.; COSTA, E. O. California Mastitis Test e whiteside modificado como critério de triagem para mastite caprina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.2, p.291-294, 1995.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiment sand observations leading to development of the California Mastitis Test. **American Journal of Veterinary Research**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.
- SIERRA, D. et al. Differential cell counts in goat's milk. In: MILKING AND MILKING PRODUCTION OF DAIRY SHEEP AND GOATS, 1998, Athens. **International symposium on the milking of small ruminants**, 6, 1999, Proceedings. Athens: Wageningen, 1999. p.178-180.
- SILVA, M. U. D.; SILVA, A. E. D. F. da. **Doenças mais frequentes observadas nos caprinos do Nordeste**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p. 33, 1987. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 3).
- SILVA, E. M. N. et al. Caracterização dos sistemas produtivos de leite de cabra nos cariris paraibano. **Revista Caatinga**, v.26, n.1, p.63-71, 2013.
- SOUZA, V. et al. **Diagnóstico da mastite subclínica caprina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2015. p.8 (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 150).
- STEFFERT, I.J. Compositional changes in cows milk associated with health problem. In: **MILK FAT FLAVOUR FORUM**, 1993, Palmerston North, New Zealand. **Proceedings...** Palmerston North, New Zealand: New Zealand Dairy Research Institute, p.119-125, 1993.
- TONIN, F.B.; NADER FILHO, A. Influência do estágio de lactação, hora e número de ordenhas sobre o teor de cloretos no leite caprino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p.64-67, 2002.
- VILANOVA, M. S. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de cabras leiteiras alimentadas com dieta contendo dois níveis de óleo de arroz. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1755-1760, 2012.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R.; BADINGS, H. T. Valor nutrition. In: **Química y física**. Zaragoza: Acribia, 1987. cap. 19, p. 320-336.
- WEGNER, T. N.; STULL, J.W. Relation between mastitis test score mineral composition of milk, and blood electrolytes profiles in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.61, n.12, p.1755-1759, 1978.

WONG, N.P., Physical properties of milk. In: Wong, N.P. (Ed.), **Fundamentals of Dairy Chemistry**, 3. Ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, 1988. 409 p.

ZANINELLI, M. et al. Monitoraggio dello stato di salute delle capre attraverso l'analisi on-line della conducibilità elettrica del latte. **Large Animal Review**, v.21, n.2, p.81–86, 2015.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. **Small Ruminant Research**, v.19, n.2, p.169-175, 1996.

ZENG S.S. et al. Daily variation in somatic cell count, composition and production of Alpine dairy goats. **Small Ruminant Research**. v.26, n.3, p.253-260, 1997.

ZENG S.S. et al. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**. v.21, n.2, p.103-107, 1999.

CAPÍTULO 2

**COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO
LEITE DE CABRAS SAANEN E ANGLO NUBIANA OBTIDAS PELO
MÉTODO ELETRÔNICO, CALBRADO COM PADRÃO DE LEITE BOVINO,
EM RELAÇÃO À CONTAGEM MICROSCÓPICA DIRETA**

RESUMO

Na caprinocultura leiteira a mastite é considerada uma das mais importantes enfermidades, pois afeta a qualidade do leite, diminui a produtividade, eleva os custos de produção e descarte precoce de fêmeas. Devido as peculiaridades fisiológica da espécie, testes de diagnóstico para a mastite subclínica podem apresentar resultados que não correspondem com a realidade. A CCS pelo método eletrônico no leite de cabra ainda é muito discutida por conta da diferença nos valores encontrados quando comparado ao método microscópico, porém, observa-se correlação positiva entre os dois métodos. Foram coletadas amostras mensais durante seis meses, de 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11). As coletas foram realizadas individualmente, por teto, totalizando 232 amostras de leite, nas quais foram realizadas pesquisa de *Staphylococcus* spp., contagem de células somáticas (CCS) pelo método microscópico e eletrônico por meio de infravermelho pelo aparelho *Combi 2500*. Usou-se um delineamento inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo Teste F a 5% para raças e Tukey a 5% para o período. Avaliou-se também a correlação entre as variáveis CCS microscópica e CCS eletrônica, utilizando a correlação de Pearson, considerando-se um nível de significância de 5%. Um modelo de regressão linear foi usado para avaliar a concordância entre a CCS automática e microscópica. A sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico. Foi possível observar correlação positiva entre os parâmetros CCS eletrônica e CCS microscópica de $r=0,88$ e associação de $R^2=0,77$; ($p<0,0001$). A CCS pelo método eletrônico superestimou 2,2 vezes a CCS microscópica. A CCS pelo método microscópico utilizando o corante pyronina Y-verde de metila foi o mais confiável e os métodos de CCS analisados apresentam alta correlação linear crescente entre si.

Palavras-Chave: CCS eletrônica; CCS microscópica; mastite subclínica

**COMPARISON OF THE SOMATIC CELL COUNT OF GOAT MILK
SAANEN AND ANGLO NUBIAN OBTAINED BY THE ELECTRONIC
METHOD, CALIBRATION WITH STANDARD TO BOVINE MILK, IN
RELATION THE DIRECT MICROSCOPIC COUNT**

ABSTRACT

In dairy goat the mastitis is considered one of the most important diseases, because it affects the quality of milk, decreases productivity, rises production costs and early discard of females. Due to the physiological peculiarities of the species, diagnostic tests for subclinical mastitis may show results that don't correspond to a reality. The CCS by the electronic method in goat's milk is still much discussed because of the difference in the values found when compared to the microscopic method, but, there is a positive correlation between the two methods. The sample were performed individually, per ceiling, totaling 232 milk samples, in which were research of *Staphylococcus* spp. and somatic cell count (SCC) by the method microscopic and electronic by means of infrared by means of infrared by the appliance *Combi 2500*. Has been used a completely randomized design and the average compared by test F 5% to race and Tukey 5% to period. Also evaluated the correlation between the variables SCC electronic and SCC microscopic using Pearson's correlation, considered a significance level of 5%. A linear regression model was used to evaluate the concordance between SCC electronic and microscopic. For the sensitivity of diagnostic tests was defined as the proportion of true positives among all sick, and specificity as the proportion of true negatives among all healthy, and the efficiency or accuracy as the proportion of the successes of diagnostic test. Was possible observed a positive correlation between the parameters SCC electronic and SCC microscopic of $r=0,88$ and association of $R^2=0,77$; ($p<0,0001$). The SCC by electronic method overestimated 2,2 times the SCC microscopic. The SCC by microscopic method using the dye pyronin-y methyl green was the most trusted and the methods of SCC analyzed showed high linear crescent correlation each other.

Key words: Subclinical mastitis; SCC electronic; SCC microscopic

INTRODUÇÃO

A qualidade do leite está diretamente relacionada à saúde, alimentação e manejo dos animais, incluindo os cuidados durante a ordenha, manuseio dos utensílios e transporte adequado do leite da fazenda até as indústrias processadoras de laticínios, (LANGONI et al., 2012). Na caprinocultura leiteira a mastite é considerada uma das mais importantes enfermidades, pois afeta a qualidade do leite, diminui a produtividade, eleva os custos de produção e descarte precoce de fêmeas.

As células de defesa provenientes da corrente sanguínea como leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células provenientes da descamação do tecido epitelial formam um conjunto de células somáticas que são utilizadas como indicativo da saúde da glândula mamária e qualidade do leite. O aumento dessas células no leite pode ser indicativo de mastite por estar relacionado à infecção intramamária (LERONDELLE et al., 1992; ZENG et al., 1997; SANCHEZ et al., 1999).

A Instrução Normativa nº 37 de 31/10/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), específica sobre leite de cabra no Brasil, não estabelece limites para CCS (BRASIL, 2000). Assim, contagens a partir 1.000.000 CS/mL têm sido utilizadas como base para detectar animais com infecção intramamária (PAES et al., 2003). Segundo Paape et al. (2007) a União Europeia também não estabelece limites legal para a CCS, porém, nos Estados Unidos o limite preconizado é de 1.000.000 CS/mL. Segundo Dulin et al. (1982), a ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 CS/mL não é raro de ser encontrado, mesmo na ausência de infecções intramamárias (ZENG e ESCOBAR, 1996). Segundo Leitner et al. (2008), o leite de cabra com menos de 400.000 CS/mL indica ausência de infecção intramamária, sendo considerado o valor ideal, porém, dificilmente obtido na prática.

O conteúdo celular no leite de cabra é maior quando comparado ao leite de vaca. Na espécie caprina, durante o processo de secreção, ocorre o desprendimento de corpúsculos anucleados, resultantes da descamação do epitélio de revestimento dos alvéolos, e liberação de algumas células com núcleo que se depositam no leite, podendo influenciar nos testes que se baseiam no aumento do conteúdo celular do leite e comprometer o diagnóstico dos animais com mastite subclínica (CONTRERAS et al., 1997).

Os métodos de diagnóstico para mastite subclínica em bovinos que se baseiam no aumento das células somáticas são confiáveis e utilizados como teste padrão pela legislação. Porém, para caprinos os testes podem indicar presença da doença mesmo quando os animais estão saudáveis, comprometendo a confiabilidade dos resultados, uma vez que os caprinos podem fisiologicamente apresentar maior quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas no leite, mesmo não estando relacionado necessariamente à infecção (LANGONI et al., 2012).

A determinação da CCS pode ser realizada pelo método manual (microscopia direta) ou eletrônico. O método manual consiste em corar o DNA das células somáticas utilizando corantes específicos para cada tipo de leite, se caracterizando por ser um processo demorado, oneroso e sujeito a erros, e o eletrônico, na contagem do DNA das células coradas por produtos químicos e irradiado com raio laser (RICHTER et al., 2013).

A CCS pelo método eletrônico no leite de cabra ainda é muito discutida por conta da diferença nos valores encontrados quando comparado ao método microscópico, porém, observa-se correlação positiva entre os dois métodos. Segundo Machado (2013) a contagem microscópica pelo método manual tem sido preconizada como a mais confiável para a determinação da CCS, principalmente quando realizado com corantes específicos para DNA, como *pyronine Y-methyl green*, pois torna possível a diferenciação entre as células somáticas e os corpúsculos citoplasmáticos depositados no leite (ZENG et al., 1999).

Tendo em vista a escassez de informação para o diagnóstico da mastite subclínica caprina o presente trabalho teve como objetivo avaliar a Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo método eletrônico e manual para o diagnóstico da enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção dos animais e coleta das amostras de leite

O experimento foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos localizada a 4 Km de Sobral-CE, durante o período de outubro de 2015 a março de 2016, utilizando 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11) (Figura 1). As fêmeas eram criadas em condições de manejo semi-intensivo com períodos de pastejo na caatinga em pasto de capim gramão, alimentadas no cocho com feno de capim tifton e suplementadas com concentrado formulado para atender as exigências nutricionais de acordo com as recomendações do NRC (1981), concentrado formulado a base de milho, soja, cálcio e fósforo, sendo ofertado 440 g de ração por animal ao dia.

Após a parição foram aguardados 40 dias para o início das coletas, respeitando os três estágios de lactação distintos: inicial (40 dias pós-fase colostrar), intermediário (cerca de 100 dias intermediários) e final (40 dias antes da secagem) (GUIMARÃES et al., 1989).

Mensalmente, na ordenha da manhã, depois da realização do exame clínico da glândula mamária, teste da Caneca Telada e da prova do CMT e a limpeza dos tetos com algodão embebido no álcool etílico 70% (v/v) em todos os animais, foram colhidas amostras de leite de cada metade mamária, sendo um frasco estéril para o exame microbiológico, um frasco contendo o conservante Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3diol) para determinação da CCS pelo método eletrônico e um frasco para CCS pelo método microscópico, perfazendo 80 amostras durante a fase inicial, 76 amostras na fase intermediária e 76 amostras na fase final, totalizando 232 amostras de leite durante todo o experimento. No mês de janeiro uma cabra da raça Anglo Nubiana secou e uma amostra da raça Saanen se perdeu. Para a coleta das amostras seguiram-se os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (1996) (OLIVER et al., 2004).

Após as coletas todas as fêmeas foram conduzidas até a sala de ordenha para retirada do leite por meio da ordenha mecânica e conduzidas posteriormente para o alojamento.



Figura 1. Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

2. Exame clínico da glândula mamária, teste da caneca telada e antissepsia dos tetos antes da ordenha

O exame clínico da glândula mamária foi realizado para o diagnóstico da mastite clínica por meio da inspeção e a palpação das metades mamárias no momento da antissepsia dos tetos, na pré-ordenha, observando-se alterações como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor.

Para a higienização dos tetos foi utilizado uma solução contendo iodo a 0,5% com o auxílio do copo sem retorno. Cada teto foi enxugado com papel toalha. E, em seguida, foram coletados os três primeiros jatos na caneca telada do fundo escuro para observar a presença de grumos, pus ou sangue (Figura 2) (RADOSTITS et al., 2002). Caso fosse diagnosticado algum animal com mastite clínica, seria tratado, porém não participaria do estudo.



Figura 2. Teste da caneca telada.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

3 Realização do *California Mastitis Test* (CMT)

Após o teste da caneca de fundo escuro foram colhidos aproximadamente 2 mL de leite de cada metade da glândula mamária em cada repartição circular da bandeja plástica, escoando o excesso de leite por meio da inclinação da bandeja, e em seguida adicionado a mesma quantidade de reagente utilizando uma pisseta evitando a formação de espuma. A homogeneização ocorreu por meio de movimentos circulares entre 10 a 15 segundos, seguido da interpretação do teste (SCHALM e NOORLANDER, 1957).

Foram consideradas positivas as misturas (leite + reagente) que apresentaram evidente formação de gel viscoso, acompanhado ou não da coloração roxa e negativo para as misturas que não se alteraram, ou seja, que não apresentaram evidência de viscosidade (Figura 3) (HIPOLITO et al., 1965).



Figura 3. Reação positiva ao CMT.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

4. Contagem de Células Somáticas (CCS)

4.1. Método microscópico

Para cada amostra de leite utilizou-se duas lâminas de vidro limpas e desengorduradas. Em cada lâmina foi feito quatro esfregaços de 1,0 cm², contendo 0,01 mL de leite, segundo metodologia preconizada por Zeng et al. (1999).

Após secagem à temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados em chama. Posteriormente as lâminas foram mergulhadas em xilol por 3 minutos, drenadas e secas. Em seguida foram hidratadas por um minuto com cada uma das seguintes soluções: etanol 50%, etanol 30% e água destilada, e, em seguida, quando secas foram corados por 6 minutos com MGP (*pyronine Y-methyl green* - SIGMA-ALDRICH®).

Para a leitura foram examinados 50 campos de dois esfregaços de cada lâmina em microscópio óptico em objetiva de imersão 100x. Calculou-se a média dos resultados obtidos e multiplicou-se pelo fator de trabalho do microscópio utilizado. O resultado final foi expresso em número de células somáticas por mL de leite (CS/mL) (Figura 3 e Figura 4).

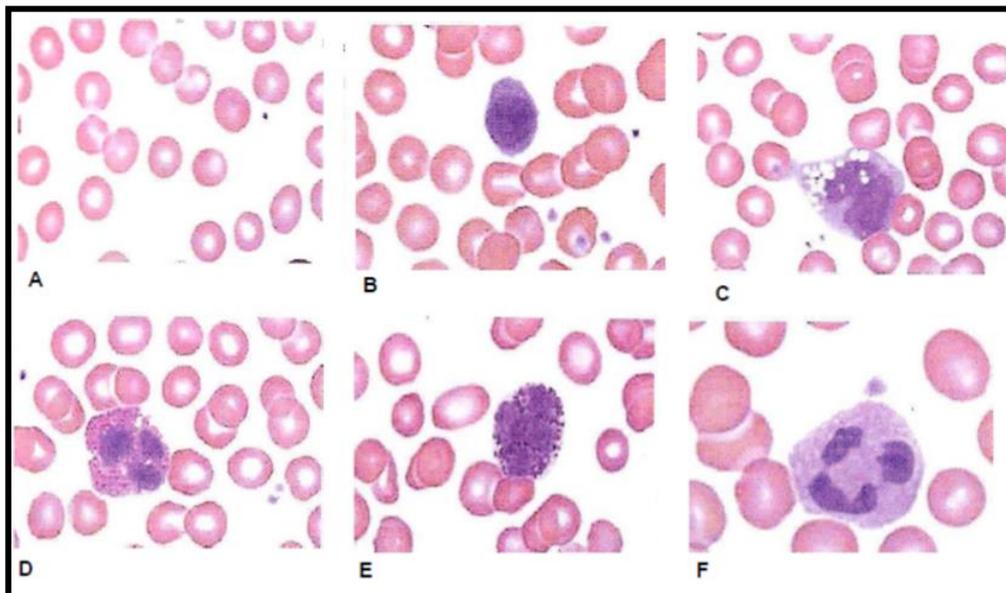


Figura 4. Referência dos elementos celulares para contagem microscópica de células somáticas presentes no leite: A (Hemácias); B (Linfócito); C (Monócito); D (Eosinófilo); E (Basófilo); F (Neutrófilo – polimorfonucleares).

Fonte: Adaptado de Prata (2001)

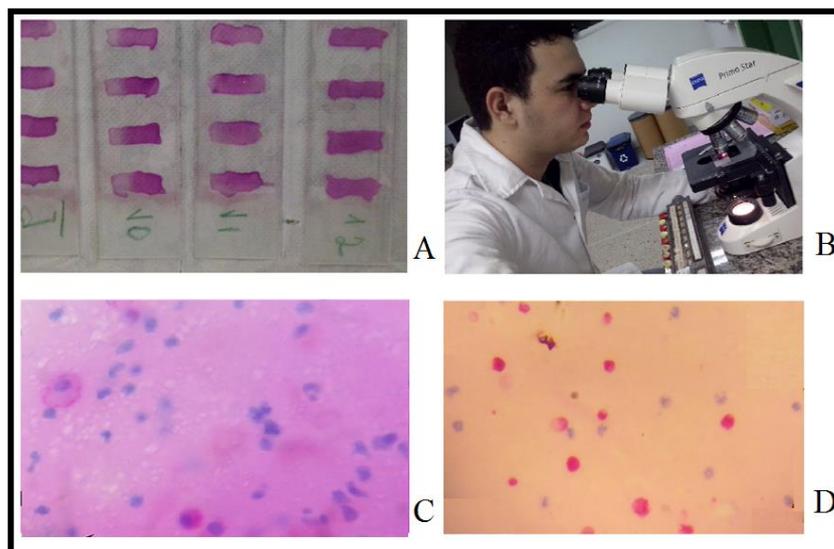


Figura 5. Contagem de células pelo método microscópico: A-lâminas coradas com *pyronine Y-methyl green*; B-contagem das células por meio da microscopia óptica; C-células somáticas (azul); D-células de descamação (vermelha).

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

4.2. Método eletrônico

Após a limpeza dos tetos com algodão embebido no álcool etílico 70% (v/v) foi colhido 60 mL de leite de cada teto em frascos contendo o conservante Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3diol). Em seguida as amostras foram homogeneizadas para garantir que o conservante dissolvesse completamente e depois os frascos identificados foram acondicionados em caixa de própria e encaminhados para a Clínica do leite – ESALQ/USP. O tempo decorrido entre a coleta e a análise das amostras foi inferior a 5 dias. A análise foi realizada por meio do aparelho *Combi* 2500, calibrado para leite de vaca (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA) (IDF, 2013; 2006).

A técnica eletrônica baseou-se no princípio de citometria de fluxo, onde os núcleos corados de células isoladas e deslocadas por um líquido de escorrimento laminar pudessem ser determinados através da objetiva do microscópio por meio da excitação de feixe laser, permitindo que os núcleos corados emitissem, por fluorescência, impulsos luminosos que foram amplificados por um fator multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (CECALAIT, 1993).

5 Isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp.

O isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp. do leite foi considerado como o teste padrão para determinação da acurácia dos demais testes de diagnósticos realizados, uma vez que a presença desses micro-organismos está associada à infecção intramamária caprina (CONTRERAS et al., 2007).

As amostras foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (1996) (OLIVER et al., 2004). Após a colheita as amostras foram identificadas e acondicionadas em uma caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Embrapa Caprinos e Ovinos.

5.1 Identificação e isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp.

Foi alçado 0,01 mL de cada amostra de leite e estriado nas placas de Petri contendo o meio Agar *Baird-Parker* com Telurito de potássio e incubado por 24 a 48 horas em estufa microbiológica a 37°C (Figura 6) (BAIRD-PARKER, 1990). A seguir, foram preparados esfregaços e corados pelo método de Gram e as culturas que apresentaram forma de cocos Gram-positivo sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas de catalase, coagulase livre e de produção de acetoina (VP) (Mac FADDIN, 1976).

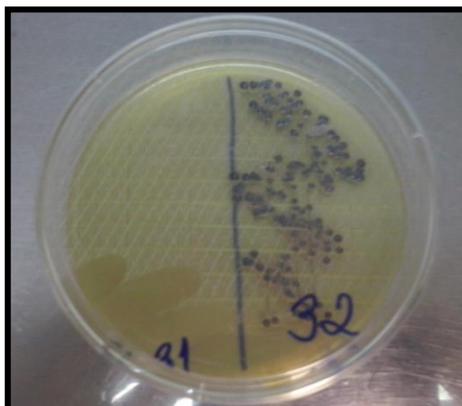


Figura 6. Colônias de *Staphylococcus* spp., em meio agar Baird-Parker.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

5.2 Teste da catalase

Realizou-se um esfregaço com uma alçada de cultivar em uma lâmina de vidro limpa e adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. As estirpes que apresentaram imediata formação de bolhas (liberação de gás) foram consideradas positivas (Figura 7) (Mac FADDIN, 1976).



Figura 7. Teste da catalase em colônias isoladas.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

5.3 Teste da coagulase livre em tubo

As colônias isoladas no meio Baird-Parker foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion - BHI*) e incubadas a 37°C por 24 horas (Mac FADDIN, 1976). Em sequência, acrescentaram-se aos tubos de ensaio, 0,5 mL de plasma de coelho diluído a 1:3 em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizado. Em seguida os tubos foram agitados e levados ao banho-maria a 37 °C com leitura realizada após uma, duas, três, quatro e 24 horas (GARCIA et al.,1980). O resultado foi considerado positivo ao constatar a coagulação do plasma (Figura 8).

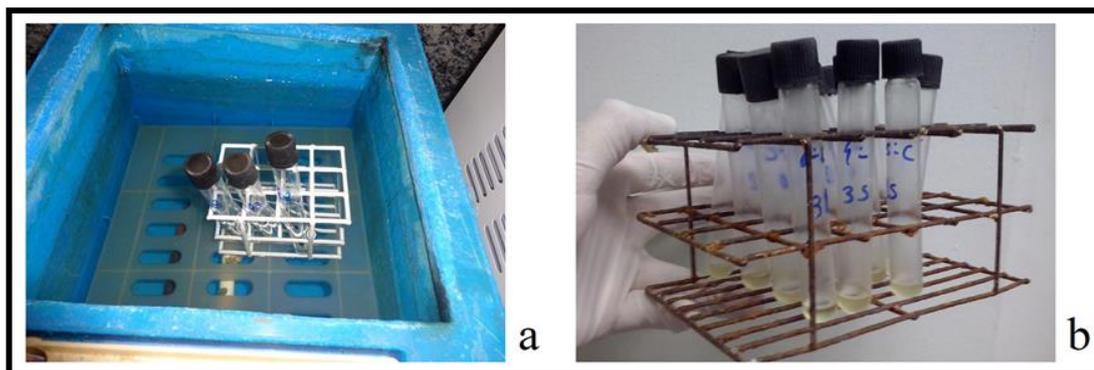


Figura 8. Teste de coagulase livre em tubo a-Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

5.4 Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoina a partir da glicose, inoculou-se uma alçada contendo estafilococos da cultura do BHI em caldo MRVP (Methyl-red Voges-Proskauer Broth) e incubou-se a 37 °C por 48 h. Em seguida foram adicionados 0,6 mL de uma solução de α -naftol a 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação, foram mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente para a realização da leitura, sendo positivo aqueles que apresentaram coloração vermelha (Figura 9) (Mac FADDIN, 1976).



Figura 9. Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

6. Análise estatística

Para a comparação das médias das variáveis \log_{10} (CCS eletrônica) e \log_{10} (CCS microscópica) foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo

teste F para raças e Tukey para o período. Avaliou-se também a correlação entre estas variáveis, utilizando a correlação de Pearson. Considerou-se um nível de significância de 5%. Um modelo de regressão linear foi usado para avaliar a concordância entre a CCS automática e microscópica. O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2 (2009).

A sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico (MEDRONHO e PEREZ, 2002). Foram elaboradas tabelas de acordo com o modelo proposto na Tabela 1, sendo possível calcular as características de cada teste diagnóstico estudado, considerando o exame microbiológico como o padrão-ouro, de acordo com o mencionado a seguir:

Tabela 1. Possíveis resultados para um teste de diagnóstico

Teste	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	a (Verdadeiro positivo)	b (Falso positivo)	a+b
Negativo	c (Falso negativo)	d (Verdadeiro negativo)	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Thrusfield (1995).

$$Se = \frac{\text{Valor positivo}}{\text{Valor positivo} + \text{Falso negativo}} \times 100$$

$$Es = \frac{\text{Valor negativo}}{\text{Valor negativo} + \text{Falso positivo}} \times 100$$

$$VPP = \frac{\text{Real positivo}}{\text{Real positivo} + \text{Falso positivo}} \times 100$$

$$VPN = \frac{\text{Real negativo}}{\text{Real negativo} + \text{Falso negativo}} \times 100$$

$$Ac = \frac{\text{Real positivo} + \text{Real negativo}}{a + b + c + d} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7 Contagem células somáticas

7.1 Método Microscópico

Para o método microscópico, considerado o padrão de referência para o leite de cabra, a média geométrica foi de 350.000 CS/mL. Esses resultados corroboram com os obtidos por Souza et al. (2015) em experimento conduzido na região de Sobral-CE, que obtiveram 499.000 CS/mL e Machado (2013), que obteve valores de 196.000 CS/mL. Monte et al. (2015) ao analisar em amostras de leite caprino pelo método microscópico utilizando o corante pironina-Y verde de metila de 135 unidades produtivas de base familiar no Cariri paraibano, obtiveram valores superiores ao do presente experimento, com média de 2.554.000 CS/mL.

Ao analisar a CCS do leite pelo método microscópico, verificou-se que do total de 232 amostras de leite, 159 (68,5%) apresentaram médias inferiores a 1.000.000 CS/mL e 73 (31,5%) superiores a 1.000.000 CS/mL, valores considerados como ponto de corte para a definição de infecção intramamária, conforme recomendações de Paes et al. (2003), uma vez que a legislação brasileira não estabelece esses valores.

Verificou-se que 159 amostras apresentaram contagens inferiores a 1.000.000 CS/mL, mas ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, constatou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. em 9 (6,0%) e nas amostras com contagens superiores a 1.000.000 CS/mL, das 73 amostras 64 (88,8%) não apresentaram isolamento (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de *Staphylococcus* spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método microscópico

Resultado Microbiológico	CCS ¹ microscópica		Total
	Acima de 1.000.000 CS/mL	Abaixo de 1.000.000 CS/mL	
<i>Staphylococcus</i> spp.	9 (12,0%)	9 (6,0%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	64 (88,0%)	150 (94,0%)	214
TOTAL	73	159	232

¹ contagem de células somáticas

Das 159 amostras de leite analisadas pelo método microscópico que apresentaram valores inferiores a 1.000.000 CS/mL, 94% não apresentaram isolamento microbiológico.

Apesar dos testes que se baseiam no conteúdo celular no leite não serem viáveis para monitorar a saúde da glândula mamária, a contagem microscópica tem sido preconizada como a mais confiável para a determinação da CCS, por ser possível a diferenciação entre as células somáticas, que são responsáveis pela defesa do organismo na presença de um agente patogênico e entre os corpúsculos citoplasmáticos, que são depositados no leite devido ao processo natural de descamação das células epiteliais na espécie caprina (LERONDELLE et al., 1992; ZENG et al., 1997; SANCHEZ et al., 1999; MACHADO, 2013).

7.2 Método Eletrônico

A CCS obtida pelo método eletrônico apresentou média geométrica de 765.000 CS/mL, valor inferior ao encontrado por Souza et al. (2015), que obtiveram média geométrica de 983.000 CS/mL. Machado (2013) ao analisar amostras de leite de cabra de 10 propriedades no estado de São Paulo obteve média geométrica de 405.000 CS/mL. Pesquisa conduzida por Neves et al. (2010), com 261 amostras de leite de cabra observaram média geométrica de 1.390.000 CS/mL, superiores aos achados do presente trabalho.

Tangorra et al. (2010) ao analisarem amostras de leite de um grupo de oito cabras da raça Saanen observaram que a média para CCS eletrônica durante a lactação das metades mamárias infectadas foram superiores quando comparada com as saudáveis, 966.000 e 500.000 CS/mL, respectivamente.

Das 225 amostras de leite analisadas pelo método eletrônico no presente estudo, verificou-se 122 (54,2%) inferiores a 1.000.000 CS/mL e 103 (45,8%) superiores a 1.000.000 CS/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de *Staphylococcus* spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com a contagem de células somáticas pelo método eletrônico

Resultado	CCS ¹ eletrônica		Total
	Acima de 1.000.000 CS/mL	Abaixo de 1.000.000 CS/mL	
Microbiológico			
<i>Staphylococcus</i> spp.	14 (13,5%)	4 (3,2%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	89 (86,5%)	118 (96,7%)	207
TOTAL	103	122	225

¹contagem de células somáticas

Verificou-se que em 122 amostras apresentaram contagens inferiores a 1.000.000 CS/mL, mas ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, utilizando o meio de cultura Baird-Parker, constatou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. em 4 (3,2%). Nas amostras com contagens superiores a 1.000.000 CS/mL, das 103 amostras, 14 (13,5%) apresentaram isolamento, totalizando 18 amostras (Tabela 3).

Foi possível identificar a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. em 18 amostras de leite dentre as 225 amostras coletadas, e ao realizar a CCS pelo método eletrônico, 14 amostras com isolamento microbiológico apresentaram valores superiores a 1.000.000 CS/mL enquanto que 4 amostras com isolamento microbiológico apresentaram valores inferiores a 1.000.000 CS/mL.

Das 122 amostras de leite analisadas pelo método eletrônico que apresentaram valores inferiores a 1.000.000 CS/mL, 96% não apresentaram isolamento microbiológico, valor considerado satisfatório para identificar animais saudáveis, podendo ser utilizado na triagem dos animais e auxiliar o produtor na tomada de decisões.

Das 232 amostras analisadas, 54 (23,3%) apresentaram contagens inferiores a 800.000 CS/mL, valor segundo Leitner et al. (2008), indicativo de um leite de alta/boa qualidade, 124 (53,5%) abaixo de 1.500.000 CS/mL indicando leite de média qualidade e 54 (23,5%) demonstraram baixa qualidade do leite, com contagens superiores a 1.500.000 CS/mL. Leite de cabra com menos de 400.000 CS/mL indica ausência de ocorrência de infecção intramamária, sendo considerado ideal, porém, dificilmente obtido na prática.

A CCS eletrônica quando realizada em equipamentos calibrado com leite de vaca superestima os valores quando comparado ao método microscópico. No presente trabalho o aparelho eletrônico superestimou 2,2 vezes a CCS microscópica. Esse resultado corroborou com os valores obtidos por Souza et al. (2015), ao analisarem 240 amostras de leite, pelo método microscópico x eletrônico, utilizando aparelho Combi 2500 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA). Esses autores verificaram que o aparelho superestimou aproximadamente 2 vezes a CCS microscópica. Machado (2013), ao analisar CCS de 513 metades mamárias verificou que o Somacount 300[®] calibrado para o leite bovino superestimou em 2,1 vezes a CCS microscópica, valores semelhantes ao obtido no presente estudo.

A contagem de células somáticas pelo método eletrônico ainda é muito discutida por conta da diferença nos valores encontrados quando comparado ao método

microscópico, porém, observa-se correlação positiva entre os dois métodos. No presente trabalho a CCS eletrônica apresentou correlação positiva de $r=0,88$ com a CCS microscópica.

Machado (2013) ao determinar a associação entre CCS automática e microscópica observou correlação de $r=0,95$. Trabalho realizado por Arcuri et al. (2004), utilizando 86 cabras das raças Saanen e Toggenburg de um criatório localizado no Município de Coronel Pacheco–MG ao correlacionar a CCS pelo método eletrônico e microscópico, obtiveram uma curva de estimação linear de $r=0,98$.

No presente trabalho observou-se elevada associação entre a CCS automática e microscópica ($R^2= 0,77$; $P=<0,0001$), com equação linear de previsão para CCS microscópica, utilizando os valores da CCS automática de $y=1,1588x - 1,2932$. (Gráfico 1). Essa equação indica que é possível estimar o valor para CCS microscópica a partir da CCS eletrônica e estabelecer um fator de correção que corrija a superestimação pelo método eletrônico.

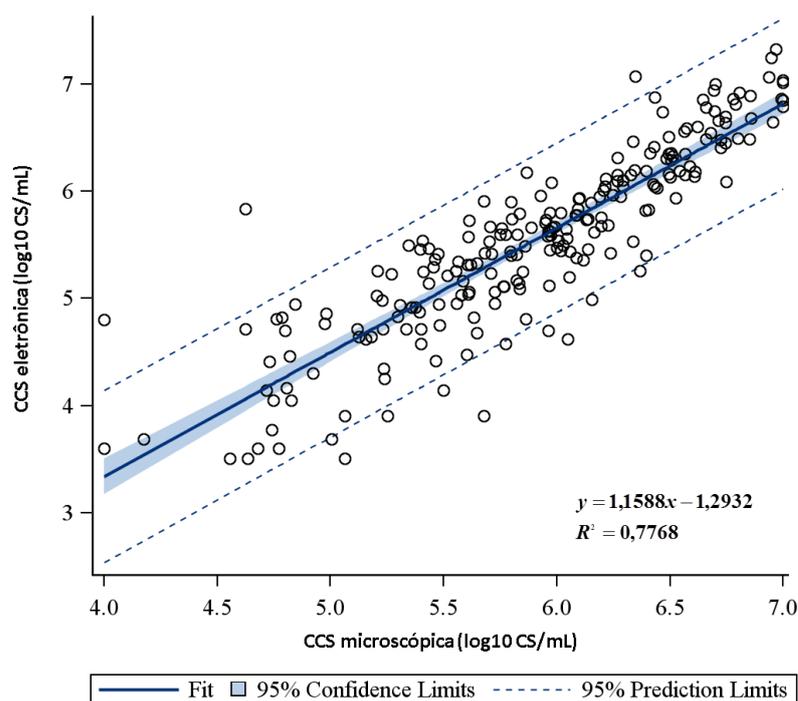


Gráfico 1. Regressão linear entre a CCS automática e microscópica.

Segundo Madureira (2006), a técnica de coloração é trabalhosa e pouco utilizada nos laboratórios de rotina, pois se trata de um teste oneroso, que leva tempo e está sujeito a erros, com isso, tem sido estudada uma equação capaz de estimar a CCS pelo método microscópico por meio da CCS pelo método eletrônico como uma possível solução, uma vez que é perceptível correlação alta entre os dois testes.

No início da lactação, compreendido entre os meses de outubro e novembro 2015, os valores encontrados para CCS eletrônica foram significativamente inferiores, seguido de um aumento nos meses de dezembro de 2015, janeiro e fevereiro de 2016, e uma redução no mês de março de 2016. As médias obtidas para os animais da raça Saanen foram superiores tanto para a CCS eletrônica quanto para CCS microscópica quando comparadas aos animais da raça Anglo Nubiano, conforme dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Contagem de células somáticas pelo método eletrônico e microscópico no leite de cabras de diferentes raças e período de lactação

Análises	Células Somáticas/mL	
	Eletrônica	Microscópica
Raça		
Saanen	2.100.000 ^a	2.000.000 ^a
Anglo Nubiano	1.400.000 ^b	1.200.000 ^b
CV(%)	117,86	176,48
Período		
Out/15	700.000 ^c	600.000 ^b
Nov/15	600.000 ^c	300.000 ^b
Dez/15	1.700.000 ^{bc}	1.400.000 ^b
Jan/16	3.600.000 ^a	3.900.000 ^a
Fev/16	2.300.000 ^b	2.000.000 ^b
Mar/16	1.500.000 ^{bc}	1.200.000 ^b
CV(%)	117,86	176,48

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey Pr<0,001

O estágio de lactação influenciou os valores determinados para CCS pelos métodos eletrônicos e microscópicos (Tabela 4). Comportamento semelhante foi observado por Vilanova et al. (2008), ao analisarem o leite de cabra durante os meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março. Os valores encontrados para CCS foram de 233.000, 1.059.000, 789.000, 500.000 e 685.000 CS/mL respectivamente, observando que os meses correspondentes ao estágio intermediário da lactação (janeiro e fevereiro) apresentaram valores mais elevados. Madureira et al. (2006) utilizando o método eletrônico observaram para a fase inicial 160.000 CS/mL de leite, seguido de aumento significativo na fase intermediária e final da lactação, com média de 508.000 e 278.000 CS/mL, respectivamente.

Observa-se ainda, que as CCS aumentaram significativamente durante o início da estação chuvosa, compreendido nos meses de janeiro e fevereiro de 2016, período em que

ocorreu precipitação pluviométrica de 226 e 104 mm na região de Sobral-CE (FUNCEME, 2016).

Em estudo realizado por Zaninelli et al. (2015), analisando a CCS entre os dias 0 (zero) a 180 de lactação observaram que durante o estágio médio e final da lactação os valores aumentaram significativamente se comparados ao início da lactação, com valores para o estágio inicial, médio e final de $5,19 \pm 0,04$ [logCCS], $5,46 \pm 0,04$ [logCCS] e $5,59 \pm 0,04$ [logCCS], respectivamente.

8 Teste de diagnóstico

Quando se utiliza um teste de diagnóstico é de fundamental importância saber a probabilidade de que um animal com resultado positivo seja realmente infectado, bem como um animal com resultado negativo seja de fato, não infectado.

Sabendo-se que o valor preditivo dos testes avaliados no presente estudo foi afetado pela sensibilidade, especificidade e prevalência baixa da mastite subclínica de 8% no rebanho, verificou-se que a Contagem de Células Somáticas pelo método microscópico e eletrônico identificou corretamente os verdadeiros positivos, 12,3% e 13,6%, respectivamente (Tabela 5).

O teste da CCS microscópica em relação ao isolamento bacteriano utilizando o meio de cultura Baird-Parker apresentou sensibilidade de 50,0%, especificidade de 70,1%, VPP de 12,3%, VPN de 94,3% e acurácia de 68,5%. E para o método eletrônico, verificou-se sensibilidade de 77,7%, especificidade de 57,0%, VPP de 13,6%, VPN de 96,7% e acurácia de 56,9% (Tabela 5).

Tabela 5. Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina

Testes	SE (%)	ES (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
CCS microscópico	50,0	70,1	12,3	94,3	68,5
CCS eletrônico	77,7	57,0	13,6	96,7	56,9

Quando a prevalência da doença é baixa os testes tendem a apresentar VPP baixo e VPN alto. No presente estudo, por ter sido realizado em um rebanho experimental localizado em apenas uma região de Sobral deduz-se que os testes avaliados não foram eficientes em diagnosticar animais com mastite subclínica, porém, é possível observar que o VPN para os testes CCS microscópico e CCS eletrônico apresentaram VPN alto,

podendo ser utilizados como teste de triagem para animais suspeitos de infecção intramamária, reduzindo os custos com o exame microbiológico.

Machado (2013), utilizando ponto de corte de 1.000.000 CS/mL obteve para o teste de CCS microscópica sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de (30%, 85%, 70% e 52%, respectivamente), ressaltando, portanto, a importância do teste para o diagnóstico.

Em trabalho realizado por Diaz et al. (2011), ao analisar o teste da CCS eletrônica em três fazendas diferentes (F1, F2 e F3), adotando valor de 1.000.000 CS/mL como ponto de corte obtiveram sensibilidade e especificidade para F1 (87% e 80%), F2 (62% e 75%) e F3 (58% e 90%), respectivamente.

Em estudo realizado por Romero et al. (2012), ao adotar o ponto de corte 300.000 CS/mL para a CCS eletrônica, a sensibilidade e especificidade foram de 85,0% e 65,0% respectivamente, e observaram que amostras contendo 2.400.000 e 800.000 CS/mL apresentaram infecção intramamária, enquanto que, até o limite de 315.000 CS/ mL as glândulas mamárias eram saudáveis.

CONCLUSÕES

A Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo método microscópico utilizando o corante pyronina Y-verde de metila é mais confiável, porém é um método demorado, trabalhoso, de alto custo laboratorial.

Os métodos de Contagem de Células Somáticas (CCS) analisados apresentam alta correlação linear crescente entre si, permitindo estabelecer uma equação linear de previsão para CCS microscópica a partir da CCS pelo método eletrônico.

A alta associação entre os dois testes indica que é possível estabelecer um fator de correção que corrija a superestimação da Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo método eletrônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCURI, E. F. et al. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p.1497-1500, 2004.
- BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, v.19, supplement, p.15-85, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 nov. 2000. Seção 1, p.23.
- CECALAIT (Centre D'études et de Contrôles des Analyses en Industrie Laitière) **La lettre** de CECALAIT, n.7, 1993.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, n.1, p.145-153, 2007.
- CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.2815-2819, 1997.
- DIAZ, J.R. et al. Analysis of the influence of variation factors on electrical conductivity of milk in Murciano-Granadina goats. **Journal Of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p.3885-3894, 2011.
- DULIN, A.M., PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v.45, n.5, p.435-439, 1982.
- FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS - FUNCEME, **Dados pluviométricos**. Disponível em: <http://www.funceme.br/app/calendario/produto/municipios/maxima/diario>. Acesso em: 04/07/2016.
- GUIMARÃES, M.P.M.P., et al. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para diagnóstico de mamite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, n.2, p.129-142, 1989.
- HIPOLITO, O. et al. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4. Ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1965. p. 26-37.
- INTERNATION DAIRY FEDERATION. **Milk and liquid products – Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry**. Brussels, Belgium, 2013, 14p. (IDF Standard, 141).

INTERNATION DAIRY FEDERATION. Milk – **Enumeration of somatic cells – part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-eletronic counters**. Brussels, Belgium, 2006, 15p. (IDF Standard, 148-2)

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.1, p.115-122, 2012.

LEITNER, G. et al. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1-3, p.221-225, 2008.

LERONDELLE, C., RICHARD, Y., ISSARTIAL, J., Factors affecting somatic cell counts in goats milk. **Small Ruminant Research**. v.8, n-1-2, p.129-139,1992.

MACHADO, G. P. **Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscopia (Prescott e Breed, 1 91 0) do leite caprino mastítico**. 2013. 217 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams; Wilkins, 1976. 312p. 1976

MADUREIRA, K. M. **Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híbridas criadas no Estado de São Paulo**. f.96, Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MEDRONHO, R. A.; PEREZ, M. A. **Testes diagnósticos**. In: MEDRONHO, R. A. (ed.). Epidemiologia. Editora Atheneu, São Paulo-SP, 2002, p. 259-270.

MONTE, D. F. M. do et al. Enumeração de células somáticas em leite caprino na Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 4, p.111-115, 2015.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison : National Mastitis Council, 1996. 64p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of goats**. Washington, D.C.: National Academy of Science, 1981. 91p.

NEVES, P. B. et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**., v. 30, n. 5, p.379-384, maio 2010.

OLIVER, S. P. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona, Wis: National Mastitis Council, 2004. 47 p.

RICHTER, E. et al. Ações de manejo e sanitárias no controle de CCS em rebanhos leiteiros agroecológicos. **Cadernos de Agroecologia**, v.8, n.2, p.1-4, 2013.

PAES, P.R.O. et al. Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p. 15-20, 2003.

PRATA, L. F.; FUKUDA, R. T. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal: Funep, 2001. 287 p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Equinos**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 1737p.

ROMERO, G. et al. Analysis of the electrical conductivity in milking fractions as a mean for detecting and characterizing mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2-3, p.157-163, 2012.

SANCHEZ, A., CONTRERAS, A., CORRALES, J. C. Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. **Small Ruminant Research**, v.31, n.3, p.197-201, 1999.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiment and observations leading to development of the California Mastitis Test. **American Journal of Veterinary Research**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.

SOUZA, V. et al. **Diagnóstico da mastite subclínica caprina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2015. p.8 (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 150).

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS Institute Inc. 2009. **SAS OnlineDoc**. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

TANGORRA, F. M. et al. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: Results from a pilot study. **Small Ruminant Research**, v. 90, n. 1-3, p.109-113, 2010.

THRUSFIELD, M. V. *Veterinary epidemiology*. 2nd ed. Cambridge: Blackwell, 1995. 479 p.

VILANOVA, M. S. et al. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras Saanen. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 3, p.235-240, 2008.

ZANINELLI, M. et al. Evaluation of the Fourier Frequency Spectrum Peaks of Milk Electrical Conductivity Signals as Indexes to Monitor the Dairy Goats' Health Status by On-Line Sensors. **Sensors**, v. 15, n. 8, p.20698-20716, 2015.

ZENG S.S. et al. Daily variation in somatic cell count, composition and production of Alpine dairy goats. **Small Ruminant Research**. v.26, n.3, p.253-260, 1997.

ZENG, S.S. ESCOBAR, E.N. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. **Small Ruminant Research**, v.19, n.2, p.169-175, 1996.

ZENG S.S. et al. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research.** v.21, n.2, p.103-107, 1999.

CAPÍTULO 3

**CARACTERÍSTICAS CELULARES DO LEITE DE CABRAS
LEITEIRAS POR MEIO DA REALIZAÇÃO DA PROVA DO CMT, TEOR DE
CLORETOS, CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, pH EM RELAÇÃO AO
ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* spp.**

RESUMO

Atualmente existem testes diagnósticos eficientes que detectam a mastite subclínica em bovinos, porém, para caprinos esses métodos ainda são controversos por apresentarem resultados falso-positivos, sendo necessário, portanto, estudos para inferir confiabilidade aos resultados obtidos para confirmação da enfermidade. Foram coletadas amostras de leite mensais durante seis meses, de 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11). As coletas foram realizadas individualmente, por teto, totalizando 232 amostras de leite, nas quais foram realizadas pesquisa de *Staphylococcus* spp., teste de condutividade elétrica (CE), pesquisa do teor de cloretos e pH. Usou-se um delineamento inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo Teste F a 5% para raças e Tukey a 5% para o período. Para sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico. O teste CMT apresentou sensibilidade de 61,1% e especificidade de 43%, não sendo portanto, recomendado para o diagnóstico da mastite. O teste de CE apresentou VPN de 100%, valor considerado alto, ou seja, o teste também foi capaz de identificar 100% dos animais verdadeiramente sadios, indicando que pode ser recomendado como prova de triagem para mastite subclínica. A prevalência de mastite subclínica causada por estafilococos coagulase-negativa foi de 8%. Os resultados encontrados para o teste de cloretos apresentaram sensibilidade de 88,8% e especificidade de 9,3%, as 210 amostras analisadas que apresentaram média superior a 0,221, 194 (92,0%) não apresentaram isolamento microbiológico, não sendo portanto eficiente em identificar cabras com mastite subclínica. O pH foi superior nas amostras com isolamento bacteriano, independente da raça.

Palavras-Chave: Cabra leiteira; Estafilococos coagulase-negativo; Estafilococos coagulase-positivo; Mastite subclínica

**CELLULAR CHARACTERISTICS OF MILK OF DAIRY GOAT BY
MEANS OF THE REALIZATION OF THE CMT TEST, CONTENT OF
CHLORIDES, ELECTRICAL CONDUCTIVITY, pH IN RELATION TO THE
INSULATION OF *Staphylococcus* spp.**

ABSTRACT

Nowadays there are efficient tests that detect subclinical mastitis in bovine, but, for goats the diagnosis is still controversial to present false positive result, Therefore, it is necessary to evaluate the available tests to infer reliability to the diagnosis of the disease. Monthly samples were collected for six months, of 20 goats of the Saanen (n = 9) and Anglo Nubian (n = 11). The sample were performed individually, per ceiling, totaling 232 milk samples, in which were research of *Staphylococcus* spp., electrical conductivity test, content of chlorides and pH,. Has been used a completely randomized design and the average compared by test F 5% to race and Tukey 5% to period. A linear regression model was used to evaluate the concordance between SCC electronic and microscopic. For the sensitivity of diagnostic tests was defined as the proportion of true positives among all sick, and specificity as the proportion of true negatives among all healthy, and the efficiency or accuracy as the proportion of the successes of diagnostic test. The CMT test showed a sensitivity of 61.1% and specificity of 43%, not being recommended for the diagnosis of mastitis. The EC test showed 100% NPV, considered high value, that is, the test was able to identify 100% of truly healthy animals, indicating that it may be recommended screening for subclinical mastitis. The prevalence of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* coagulase-negative was 8%. The results found for the chlorides test showed sensitivity of 88.8% and specificity of 9.3%, the 210 analyzed samples that presented an average higher than 0.221, 194 (92.0%) didn't present microbiological isolation, being therefore not efficient in identifying goats with subclinical mastitis. the pH was higher in samples with bacterial isolation, independent of race.

Key words: Dairy goat; *Staphylococcus* coagulase-negative; *Staphylococcus* coagulase-positive; subclinical mastitis

INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença infectocontagiosa causada por micro-organismos patogênicos que afetam a saúde da glândula mamária e provocam alterações macro e microscópica no leite.

A classificação da mastite pode ser dada de acordo com grau de infecção, em clínica e subclínica. A clínica é caracterizada por apresentar sintomas visíveis no úbere do animal como edema, dor, rubor e aumento da temperatura e alterações no leite, como, presença de grumos, pus, sangue e alteração na cor (COSTA, 1998). Já a mastite subclínica, só é possível ser detectada por meio de testes laboratoriais.

A mastite clínica caprina é causada principalmente por *Staphylococcus aureus* e em casos subclínico da doença, por estafilococos coagulase-negativos (ECN) (FASULKOV et al., 2015).

Segundo Bianchini et al. (2010), independente da região ou país, a mastite subclínica caprina apresenta o mesmo padrão em casos de infecção intramamária, sendo o *Staphylococcus* spp o principal agente causador da doença.

Em estudo conduzido por Salaberry et al. (2015), utilizando placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%), das 226 amostras de leite proveniente de sete propriedades de caprinos leiteiros, 122 amostras apresentaram multiplicação bacteriana, e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) coagulase-negativa e 20 (16,4%) coagulase-positiva, nove (7,4%) *Corynebacterium* spp. e três (2,5%) *Streptococcus* spp.

Contreras et al. (2007), relataram que infecções intramamárias causadas por *S. aureus* necessitam de maior atenção por causarem danos à saúde dos animais e prejuízo na produção, serem resistentes aos antibióticos, possuem alta patogenicidade e apresentar implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que produzem toxinas que podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos destinados aos consumidores, caracterizando quadros de intoxicação alimentar (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Durante o processo inflamatório da glândula mamária ocorre a destruição das junções celulares e do sistema bomba ativa, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos e permitindo que a taxa de passagem de íons de cloretos presentes no sangue

seja maior que o normal, ocasionando mudanças na composição físico-química do leite (WEGNER e STUUL, 1978; DELLA LIBERA et al., 2011).

Por meio de testes sensíveis aos íons de cloreto é possível detectar os animais que apresentam mastite subclínica, uma vez que o aumento da presença de cloretos no leite está associado ao quadro de infecção intramamária. Quando a presença de cloreto de sódio está acima de 0,2% é um indicativo de mastite subclínica (BARCELLOS, SILVA e MARQUES JÚNIOR, 1987).

O aumento da concentração dos íons de Na^+ e Cl^- e redução de K^+ , decorrente da infecção intramamária, influencia na condutividade elétrica e pH do leite, tornando-o mais alcalino, uma vez que o aumento de cloro eleva o pH para valores próximos de 7 (sete), leite típico alcalino, sendo considerado como indicativo de mastite subclínica (CALLEFE e LANGONI, 2015).

Segundo os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, para o leite de cabra fresco admite-se pH ligeiramente ácido, em torno de 13 a 18 °Dornic, expresso em pH 6,5 a 6,8 respectivamente (BRASIL, 2000).

A avaliação microbiológica é considerada “padrão-ouro” por ser o melhor teste para o diagnóstico da mastite subclínica caprina, pois vários agentes etiológicos podem causar a doença e a presença de micro-organismos no leite é um indicativo de infecção intramamária (CONTRERAS et al., 2007). Por ser um método oneroso e demorado, que depende de laboratório, testes capazes de identificar alterações no leite estão sendo estudados para avaliar a confiabilidade para o diagnóstico da doença em casos de mastite subclínica caprina.

Tendo em vista a escassez de informações para o diagnóstico da mastite subclínica caprina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a validade preditiva dos testes *California Mastitis Test* (CMT), teor de cloretos, condutividade elétrica (CE) e pH em relação ao isolamento de *Staphylococcus* spp. para o diagnóstico da mastite subclínica caprina.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Seleção dos animais e coleta das amostras de leite

O experimento foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos localizada a 4 Km de Sobral-CE, durante o período de outubro de 2015 a março de 2016, utilizando 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11) (Figura 1), criadas em condições de manejo semi-intensivo com períodos de pastejo na caatinga em pasto de capim gramão, alimentadas no cocho com feno de capim tifton e suplementadas com concentrado formulado para atender as exigências nutricionais dos animais em lactação segundo recomendado pelo NRC (1981), concentrado formulado a base de milho, soja, cálcio e fósforo, ofertado 440 g de ração por animal ao dia durante todo o experimento.



Figura 1. Animais da raça Saanen e Anglo Nubiana utilizados no experimento.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

Após a parição foram aguardados 40 dias para o início das coletas, respeitando os três estágios de lactação distintos: inicial (40 dias pós-fase colostrar), intermediário (cerca de 100 dias intermediários) e final (40 dias antes da secagem) (GUIMARÃES et al., 1989).

Mensalmente, na ordenha da manhã, depois da realização do exame clínico da glândula mamária, teste da Caneca Telada e da prova do CMT e a limpeza dos tetos com algodão embebido no álcool etílico 70% (v/v) em todos os animais, foram colhidas amostras de leite de cada metade mamária, sendo um frasco estéril para o exame microbiológico e um frasco para detecção do teor de cloretos, pH, CE, perfazendo 80 amostras durante a fase inicial, 76 amostras na fase intermediária e 76 amostras na fase final, totalizando 232 amostras de leite durante todo o experimento. No mês de janeiro

uma cabra da raça Anglo Nubiana secou e uma amostra da raça Saanen se perdeu. Para a coleta das amostras seguiram-se os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (1996) (OLIVER et al., 2004).

Durante a ordenha foram aplicadas as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) visando melhorar as condições sanitárias dos animais. Para isso adotou-se:

- Higienização adequada das mãos dos ordenhadores, assim como dos equipamentos, utensílios e instalações;
- Foi estabelecida uma linha de ordenha;
- Realização do teste da caneca telada do fundo escuro;
- Antissepsia dos tetos pré ordenha (Pré-dipping) usando uma solução desinfetante com iodo a 0,5%;
- Após as coletas todas as fêmeas foram conduzidas até a sala de ordenha para retirada do leite por meio da ordenha mecânica e encaminhadas para o alojamento.
- Antissepsia dos tetos pós ordenha (Pós-dipping) com uma solução desinfetante à base de iodo e glicerina;
- O concentrado foi fornecido após a ordenha para manter os animais em pé, evitando a entrada de micro-organismos para a glândula mamária.

2 Exame clínico da glândula mamária, teste da caneca telada e antissepsia dos tetos antes da ordenha

O exame clínico da glândula mamária foi realizado para o diagnóstico da mastite clínica por meio da inspeção e a palpação das metades mamárias no momento da antissepsia dos tetos, na pré-ordenha, observando-se alterações como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor.

Para a higienização dos tetos foi utilizado uma solução contendo iodo a 0,5% com o auxílio do copo sem retorno. Cada teto foi enxugado com papel toalha. E, em seguida, foram coletados os três primeiros jatos na caneca telada do fundo escuro para observar a presença de grumos, pus ou sangue (Figura 2) (RADOSTITS et al., 2002). Caso fosse diagnosticado algum animal com mastite clínica, seria tratado, porém não participaria do estudo.



Figura 2. Teste da caneca telada.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

3 Realização do *California Mastitis Test* (CMT)

Após o teste da caneca de fundo escuro foram colhidos aproximadamente 2 mL de leite de cada metade da glândula mamária em cada repartição circular da bandeja plástica, escoando o excesso de leite por meio da inclinação da bandeja, e em seguida adicionado a mesma quantidade de reagente utilizando uma pisseta evitando a formação de espuma. A homogeneização ocorreu por meio de movimentos circulares entre 10 a 15 segundos, seguido da interpretação do teste (SCHALM e NOORLANDER, 1957).

Foram consideradas positivas as misturas (leite + reagente) que apresentaram evidente formação de gel viscoso, acompanhado ou não da coloração roxa e negativo para as misturas que não se alteraram, ou seja, que não apresentaram evidência de viscosidade (Figura 3) (HIPOLITO et al., 1965).



Figura 3. Reação positiva ao CMT.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

4 Teor de cloretos

Para o procedimento pipetou-se 10 mL de leite em um béquer de 50 mL e adicionou-se 5 gotas de cromato de potássio a 5%. Após prévia homogeneização, as amostras de leite foram submetidas à análise quantitativa do teor de cloretos pela técnica de titulação pelo nitrato de prata 0,1N.

O princípio da prova consiste na reação do nitrato de prata com íons cloreto presentes no leite, formando sal de prata. O excesso de íons de prata produz, com o indicador cromato de potássio, um complexo de coloração alaranjado-escuro (AMARAL et al., 1988).

O volume utilizado de nitrato de prata durante a titulação da amostra de leite foi multiplicado pelo fator 0,0355 que corresponde ao peso molecular do cloreto no NaCl, para calcular a concentração do teor de cloretos presente nas amostras (Figura 4) (MORITA e ASSUMPCÃO, 1972).

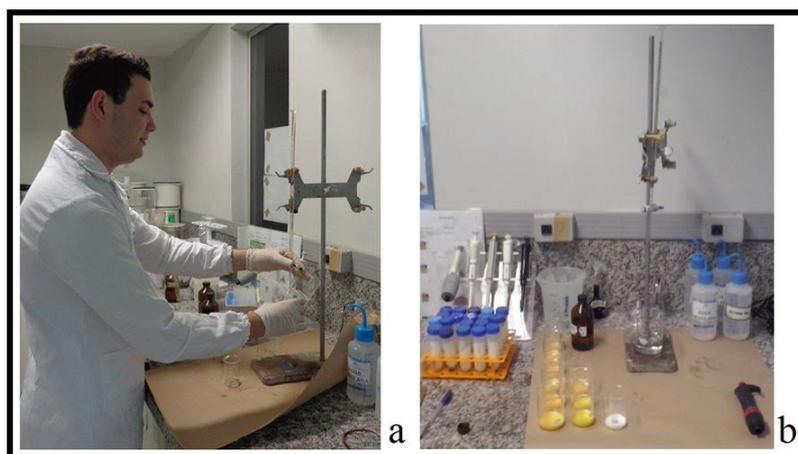


Figura 4. Teste de cloretos em leite de cabra: a - Titulação da amostra de leite b - coloração alaranjado-escuro após a titulação como indicador de excesso de íons de prata. Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

5 pH e Condutividade Elétrica (CE)

Para a realização do teste foram coletados 20 mL de leite de cada metade mamária em tubos falcon, destes, 10 mL foram utilizados para análise do pH e 10 mL para o teste da CE. Para verificar o pH utilizou-se um eletrodo acoplado ao analisador ultrassônico de leite - Lactoscan SA (Entelbra). Simultaneamente, foi realizado o teste de CE por meio do sensor integrado ao sistema e os resultados mensurados em miliSiemens (mS) por meio do aparelho Lactoscan SA (Figura 5).



Figura 5. Lactoscan SA para os testes pH e CE.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

6 Isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp.

O isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp. do leite foi considerado como o teste padrão para determinação da acurácia dos demais testes de diagnósticos realizados, uma vez que a presença desses micro-organismos está associada à infecção intramamária caprina (CONTRERAS et al., 2007).

As amostras foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (1996) (OLIVER et al., 2004). Após a colheita as amostras foram identificadas e acondicionadas em uma caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Embrapa Caprinos e Ovinos.

6.1 Identificação e isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp.

Foi alçado 0,01 mL de cada amostra de leite e estriado nas placas de Petri contendo o meio Agar *Baird-Parker* com Telurito de potássio e incubado por 24 a 48 horas em estufa microbiológica a 37°C (Figura 6) (BAIRD-PARKER, 1990). A seguir, foram preparados esfregaços e corados pelo método de Gram e as culturas que apresentaram forma de cocos Gram-positivo sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas de catalase, coagulase livre e de produção de acetoína (VP) (Mac FADDIN, 1976).

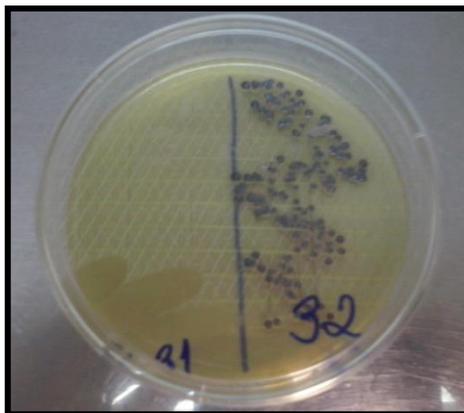


Figura 6. Colônias de *Staphylococcus* spp., em meio agar Baird-Parker.
Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

6.2 Teste da catalase

Realizou-se um esfregaço com uma alçada de cultivar em uma lâmina de vidro limpa e adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. As estirpes que apresentaram imediata formação de bolhas (liberação de gás) foram consideradas positivas (Figura 7) (Mac FADDIN, 1976).



Figura 7. Teste da catalase em colônias isoladas.
Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

6.3 Teste da coagulase livre em tubo

As colônias isoladas no meio Baird-Parker foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas (Mac FADDIN, 1976). Em sequência, acrescentaram-se aos tubos de ensaio, 0,5 mL de plasma de coelho diluído a 1:3 em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizado. Em seguida os tubos foram agitados e levados ao banho-maria a 37 °C com leitura realizada após uma, duas, três, quatro e 24 horas (GARCIA et al.,1980). O resultado foi considerado positivo ao constatar a coagulação do plasma (Figura 8).

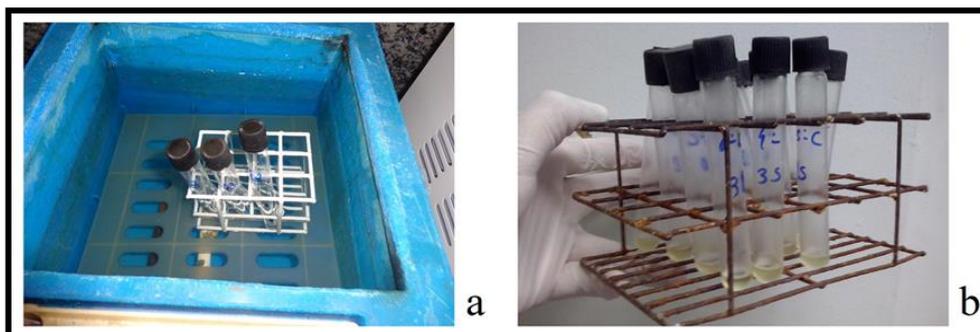


Figura 8. Teste de coagulase livre em tubo a- Tubos de ensaio contendo o caldo de infusão de cérebro e plasma de coelho ao banho-maria b- Tubos de ensaio após 24 horas sem formação de coágulo.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

6.4 Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoina a partir da glicose, inoculou-se uma alçada contendo estafilococos da cultura do BHI em caldo MRVP (Methyl-red Voges-Proskauer Broth) e incubou-se a 37 °C por 48 h. Em seguida foram adicionados 0,6 mL de uma solução de α -naftol a 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação, foram mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente para a realização da leitura, sendo positivo aqueles que apresentaram coloração vermelha (Figura 9) (Mac FADDIN, 1976).



Figura 9. Resultado negativo nos tubos laterais e positivo (coloração vermelha) no tubo central para o teste de Voges-Proskauer.

Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

7 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos da normalidade e homogeneidade, respectivamente. As associações entre os testes microbiológicos no meio Baird-Parker e CMT foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Qui-quadrado.

Para a comparação das médias das variáveis Cloretos, Condutividade, pH, entre os grupos POSITIVO e NEGATIVO do CMT e do Microbiológico foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F para raças e Tukey para o período. Considerou-se um nível de significância de 5%. O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2 (2009).

A sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico (MEDRONHO e PEREZ, 2002). Foram elaboradas tabelas de acordo com o modelo proposto na Tabela 1, sendo possível calcular as características de cada teste diagnóstico estudado, considerando o exame microbiológico como o padrão-ouro, de acordo com o mencionado a seguir:

Tabela 1. Possíveis resultados para um teste de diagnóstico

Teste	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	a (Verdadeiro positivo)	b (Falso positivo)	a+b
Negativo	c (Falso negativo)	d (Verdadeiro negativo)	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Thrusfield (1995).

$$Se = \frac{\text{Valor positivo}}{\text{Valor positivo} + \text{Falso negativo}} \times 100$$

$$Es = \frac{\text{Valor negativo}}{\text{Valor negativo} + \text{Falso positivo}} \times 100$$

$$VPP = \frac{\text{Real positivo}}{\text{Real positivo} + \text{Falso positivo}} \times 100$$

$$VPN = \frac{\text{Real negativo}}{\text{Real negativo} + \text{Falso negativo}} \times 100$$

$$Ac = \frac{\text{Real positivo} + \text{Real negativo}}{a + b + c + d} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

8 Isolamento Microbiológico

Durante o período experimental não houve manifestação de mastite clínica nos animais envolvidos na pesquisa.

Do leite avaliado, foram isoladas e identificadas 18 estirpes de *Staphylococcus* spp.. Todas foram coagulase-negativas e catalase-positivas, e apenas uma foi positiva ao teste de produção de acetoina (VP). Todas as colônias isoladas foram cocos gram-positivos em formato de cachos de uva (Figura 10).

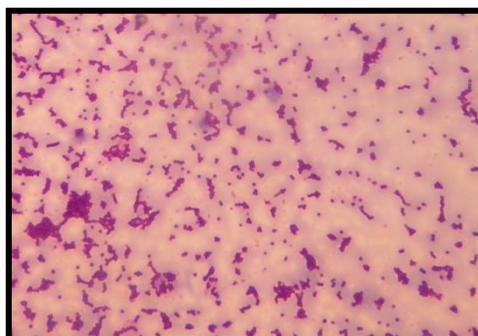


Figura 10. *Staphylococcus* spp. Cocos gram-positivo em forma de cachos de uva.
Fonte: Arquivo Pessoal, Moura, J. W. F. (2015)

A ocorrência de estafilococos coagulase negativas (ECN) é comum em casos de mastite subclínica. Em estudo realizado por Gomes et al. (2014), o principal agente etiológico associado à infecção intramamária em cabras leiteiras também pertenceram ao grupo ECN, sendo isolado em 90,5% das amostras de leite analisadas. Esses autores também observaram a presença de *Corynebacterium* spp em 5,40% e *Staphylococcus aureus* em 4,05% das amostras analisadas.

Os resultados obtidos nos exames microbiológicos do presente estudo corroboram com outros autores, que também encontraram maior frequência de ECN em casos de mastite subclínica. Em estudo realizado por Salaberry et al. (2016), observaram que do total de 214 amostras coletadas, 122 apresentaram multiplicação bacteriana, e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) ECN e 20 (16,4%) estafilococos coagulase positivo (ECP), nove (7,4%) *Corynebacterium* spp. e três (2,5%) *Streptococcus* spp, reforçando a importância dos ECN em casos de mastite subclínica caprina.

Cavalcante et al. (2013), ao analisarem 61 amostras de leite, observaram maior prevalência para *Staphylococcus* spp. (90,3%), sendo o *S. aureus* (29,5%) o agente mais isolado, seguido de *S. intermedius* (26,2%), *S. epidermidis* (21,3%) e outros ECN (14,7%). Também foram isolados *Streptococcus* spp. (4,9%), *Micrococcus* spp. (1,7%) e *Enterobacter* spp. (1,7%).

Langoni et al. (2012), observaram que os micro-organismos mais isolados foram os *S. aureus* (34,6%), seguido pelo *S. epidermidis* (26%), *Staphylococcus caprae* (25%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,7%), *Corynebacterium bovis* (2,9%), *Streptococcus uberis* (1,9%), *Escherichia coli* (1,9%) e *Micrococcus* spp. (1%).

Em análise realizada por Almeida et al. (2013), do total de 129 amostras de leite 74 (57,4%) apresentaram multiplicação microbiológica, sendo o patógeno mais prevalente o estafilococos coagulase-negativa, que ocorreu em 59 amostras (79,7%), seguido de *Streptococcus* spp. em seis amostras (8%), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp. e *E. coli* em três amostras (4%), estafilococos coagulase-positiva em duas amostras (2,7 %) e *Klebsiella* spp. em uma amostra (1,3%).

9 Exame clínico da glândula mamária e teste *California Mastitis Test*

O número de amostras positivas ao CMT foram superiores nos meses entre dezembro de 2015 e março de 2016 (fase intermediária e final da lactação), quando comparado aos meses de outubro e novembro de 2015 (fase inicial da lactação) (Tabela 2).

Tabela 2. Reação ao *California Mastitis Test* das metades mamárias de cabras leiteiras de diferentes raças em diferentes períodos de coleta

Coleta	Anglo Nubiano (n=11)		Saanen (n=9)		Total	
	+	-	+	-	+	-
Out/2015	0	22	6	12	6 ^d	34 ^a
Nov/2015	4	18	3	15	7 ^{cd}	33 ^a
Dez/2015	7	15	9	9	16 ^{bcd}	24 ^{ab}
Jan/2016	17*	3	13**	3	30 ^a	6 ^c
Fev/2016	10*	10	13	5	23 ^{ab}	15 ^{bc}
Mar/2016	4*	16	13	5	17 ^{bc}	21 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey P<0,001

* animais secaram

** amostras perdidas

Durante a fase inicial, entre os meses de outubro e novembro de 2015, 13 amostras de leite foram positivas ao CMT e 67 negativas; na fase intermediária, entre os meses de dezembro de 2015 e janeiro de 2016, foram 46 amostras positivas ao CMT e 30 negativas;

e na fase final, entre os meses de fevereiro e março de 2016, foram 40 amostras positivas ao CMT e 36 negativas (Tabela 2).

O alto índice de resultados falso-positivos se deve à forma de secreção de leite da espécie caprina, que por ser apócrina, é comum que ocorra a presença de corpúsculos citoplasmáticos contendo fragmentos de núcleo e células de descamação que podem influenciar na intensidade da reação (PAAPE e CAPUCO, 1997). Segundo Dulin et al. (1982), a quantidade de células de descamação aumenta durante o declínio da curva de lactação, elevando o índice de resultados falso-positivos ao teste CMT.

Do leite oriundo das metades mamárias avaliadas, 133 (57,3%) reagiu ao teste CMT, contudo, em apenas 11 (8,0%) verificou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de *Staphylococcus* spp., em número absoluto e respectiva porcentagem, encontrados no cultivo microbiológico seletivo no leite avaliado, de acordo com o *California Mastitis Test*

Resultado Microbiológico	CMT ¹		Total
	Positivo	Negativo	
<i>Staphylococcus</i> spp.	11 (8,0%)	7 (7,0%)	18
Sem isolamento bacteriano no Baird-Parker	122(92,0%)	92 (93,0%)	214
TOTAL	133	99	232

¹*California Mastitis Test.*

No presente estudo o teste CMT foi positivo para 133 amostras de leite, dessas, 11 (8,0%) apresentaram isolamento microbiológico no meio Baird-Parker e 122 (92,0%) não apresentaram isolamento. Sendo assim, resultados positivos ao teste CMT podem não estar necessariamente relacionados à infecção intramamária, uma vez que os ECN são os principais agentes envolvidos em caso de mastite subclínica caprina.

Cavalcante et al. (2013), ao analisarem amostras de leite de 218 fêmeas, verificaram que 58 (26,6%) apresentaram resultado positivo ao CMT, as quais foram coletadas para exame bacteriológico. Das 107 amostras de leite positivas ao teste, 61 (57,0%) apresentaram multiplicação bacteriana e, após correlacionar os resultados bacteriológicos encontrados com o total de fêmeas positivas ao CMT, verificou-se que 82,7% estavam com mastite subclínica.

Verificou-se que em 99 amostras de leite negativas ao CMT, 7 (7,0%) apresentaram isolamento microbiológico no meio Baird-Parker (falso negativo) e 92 (93,0%) não apresentaram isolamento (Tabela 3).

Em estudo realizado por Almeida et al. (2013), das 129 amostras de leite analisadas, apenas seis foram positivas ao CMT, destas, três continham ECN, duas *E. coli* e uma *Klebsiella* spp. Uma amostra foi positiva ao CMT, porém, negativa ao exame microbiológico, demonstrando que a correlação entre os testes utilizados foi considerada baixa.

9 Cloretos

O teor de cloretos encontrado nesse estudo variou entre 0,159 a 0,426 g/100 mL, com média de 0,267 g/100 mL. Valores semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (2013), que ao analisarem o teor de cloretos em leite de cabras de 11 propriedades dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro obtiveram valores mínimo, máximo e médio de 0,120, 0,690 e 0,250 g/100 mL, respectivamente.

Em estudo realizado por Lima Júnior et al. (1994) foi observado valor médio de 0,204 mg/100 mL de teor de cloretos no leite de cabra, reafirmando os achados de Barros e Leitão (1992), cujos valores também mostraram-se elevados.

É possível observar que as médias para o teste de cloretos não diferiram entre glândulas mamárias saudáveis e com isolamento microbiológico (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de cloretos obtidos no leite entre diferentes raças com e sem isolamento microbiológico

Resultado microbiológico	Saanen	Anglo Nubiana	Geral
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,274 ^a	0,315 ^a	0,295 ^a
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	0,274 ^a	0,276 ^a	0,275 ^a

Não houve diferença entre as raças avaliadas pelo teste F Pr=0,138

No presente estudo, o teor de cloretos no leite de cabra não variou em função da infecção intramamária. Trabalho realizado por Diaz et al. (2012), utilizando cabras da raça Murciano-Granadina, divididas nos grupos: sem infecção intramamária, infectadas e tratadas, infectadas durante o experimento e ambas as glândulas infectadas, obtiveram valores para o teor de cloretos antes do estabelecimento da infecção de 0,192, 0,189, 0,183 e 0,208 g/100 mL respectivamente. Após o estabelecimento da infecção os valores foram de 0,193, 0,201, 0,192 e 0,221 g/100 mL, respectivamente. Os autores concluíram que

houve aumento no teor de cloretos após a infecção, enquanto que, em animais com glândulas saudáveis não houveram mudanças. Ao analisarem a relação sódio:potássio e a interrelação dos dois fatores, observaram diferença apenas em animais que apresentaram infecção intramamária bilateral.

Das 232 amostras de leite analisadas pelo teste de cloretos, no presente estudo, 22 (9,5%) apresentaram médias inferiores a 0,221 g/100 mL e 210 (90,5%) superiores a 0,221 g/100 mL (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de *Staphylococcus* spp. encontrados no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teor de cloretos

Resultado microbiológico	Cloretos g/100 mL		Total
	Acima de 0,221	Abaixo de 0,221	
<i>Staphylococcus</i> spp.	16 (8,0%)	2 (9,0%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	194 (92,0%)	20 (91,0%)	214
TOTAL	210	22	232

Verificou-se que 22 amostras apresentaram valores inferiores a 0,221 g/100mL, mas ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, constatou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. em 2 (9,0%). Nas amostras com valores superiores a 0,221 g/100mL, das 210 amostras, 194 (92,0%) não apresentaram isolamento (Tabela 5).

A raça não interferiu no teor de cloretos, porém é possível observar valores crescentes durante o estágio inicial, médio e final da lactação (Tabela 6).

Tabela 6. Teor de cloretos no leite de cabra de diferentes raças e estágio de lactação

Análises	Cloretos
Raças	
Anglo Nubiana	0,279 ^a
Saanen	0,274 ^a
Período	
Out/15	0,236 ^c
Nov/15	0,272 ^b
Dez/15	0,253 ^{bc}
Jan/16	0,296 ^a
Fev/16	0,310 ^a
Mar/16	0,298 ^a
CV (%)	11,013

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey Pr<0,001

Em estudo realizado por Tonin et al. (2002), os teores de cloretos apresentaram valores crescentes durante os estágios de lactação em cabras ordenhadas uma vez ao dia, encontrando valores médios no período inicial, médio e final de 0,179, 0,201 e 0,216 g/100 mL, respectivamente. Para fêmeas ordenhadas duas vezes ao dia os valores obtidos na ordenha da manhã foram de 1,75, 0,211 e 0,213 g/100 mL, e pela tarde de 0,183, 0,217 e 0,213 g/100 mL, respectivamente.

10 Condutividade Elétrica e pH

O teste de CE do presente estudo apresentou valores entre 4,67 e 8,13 mS/cm, média de 5,79 mS/cm e mediana de 5,74 mS/cm. Romero et al. (2012), ao analisarem o leite de fêmeas primíparas (28) e múltíparas (56) da raça Murciano-Granadina no quarto mês de lactação obtiveram média de 5,07 e 5,45mS/cm, respectivamente.

No presente estudo, não houve diferença entre a CE proveniente de glândulas mamárias saudáveis das que apresentaram isolamento microbiológico (5,79 e 6,01 mS/cm, respectivamente) (Tabela 7). O mesmo foi observado por Romero et al. (2012), que ao analisarem os primeiros 100 mL de leite obtidos durante o início da ordenha e o leite obtido durante a ordenha mecânica observaram que não houve diferença da CE do leite proveniente de glândulas mamárias saudáveis (5,42 e 5,26 mS/cm respectivamente) das infectadas (5,44 e 5,29 mS/cm respectivamente). Porém, ao analisarem o leite obtido no final da ordenha a CE foi superior para glândulas mamárias infectadas (5,14 mS/cm) quando comparada com as não infectadas (5,01 mS/cm).

Tabela 7. Condutividade Elétrica (CE) e pH em leite de cabras Anglo Nubiana e Saanen

Resultado microbiológico	Condutividade elétrica mS/cm	pH
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,01 ^a	6,71 ^a
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	5,79 ^a	6,58 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste F P<0,05

Resultados obtidos por Diaz et al. (2011), em experimento realizado em três diferentes fazendas, 2 comerciais (fazenda 1=250 animais e fazenda 2=800 animais) e uma fazenda experimental (fazenda 3=200 animais) todas localizadas no Sudeste da Espanha, observaram que para glândulas mamárias saudáveis, os valores encontrados para as fazendas 1, 2 e 3 foram de 5,01, 5,67 e 5,63 mS/cm e para glândulas com infecção foram de 5,09, 5,69 e 5,73 mS/cm, respectivamente.

Diaz et al. (2011), relataram que o grupo de fêmeas com glândulas sem isolamento bacteriano, porém, com média superior a 1.000.000 CS/mL apresentaram médias superiores para CE (5,75 e 5,79 mS/cm em primíparas e multíparas, respectivamente), quando comparadas com animais com glândulas saudáveis (5,15 e 5,66 mS/cm em primíparas e multíparas, respectivamente). Os autores não observaram diferença quando compararam fêmeas com glândulas mamárias infectadas por bactérias (5,29 e 5,68 mS/cm a primíparas e multíparas, respectivamente) das fêmeas saudáveis.

Tangorra et al. (2010), ao analisarem a média dos 20 maiores resultados obtido no teste da CE um grupo de 8 cabras da raça Saanen de segunda parição observaram que os valores aumentaram durante os estágios de lactação e em glândulas mamárias com infecção. Nas fases inicial, média e final para glândulas mamárias saudáveis foram $10,71 \pm 0,14$, $13,72 \pm 0,12$ e $14,66 \pm 0,15$ mS/cm e para glândulas doentes $11,74 \pm 0,13$, $14,06 \pm 0,13$ e $14,57 \pm 0,09$ mS/cm, respectivamente.

No presente estudo, adotou-se como valor médio, 5,20 mS/cm, conforme determinado por Romero et al. (2012). Das 232 amostras de leite analisadas pelo teste de CE, 13 (5,6%) foram inferiores a 5,20 mS/cm e 219 (94,4%) foram superiores a 5,20 mS/cm (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição de *Staphylococcus* spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teste de Condutividade Elétrica

Resultado Microbiológico	Condutividade elétrica		Total
	Acima de 5,20 mS/cm	Abaixo de 5,20 mS/cm	
<i>Staphylococcus</i> spp.	18 (8,0%)	0 (0%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	201 (92,0%)	13 (100%)	214
TOTAL	219	13	232

Verificou-se que 13 amostras apresentaram valores abaixo de 5,20 mS/cm e ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, não houve presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Nas 219 amostras com valores superiores a 5,20 mS/cm, 201 (92,0%) não apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp. (Tabela 8).

Verificou-se que os valores para a CE obtidos para os animais da raça Saanen foram superiores ($p < 0,001$) aos da raça Anglo Nubiana (Tabela 9), com valores de 5,80 mS/cm e 5,72 mS/cm, respectivamente.

A CE foi influenciada pelos estágios de lactação apresentando diferença entre os meses de coleta, conforme Tabela 9. Durante os meses de novembro de 2015 e janeiro de 2016 a CE foi maior quando comparado aos meses de outubro de 2015, fevereiro e março de 2016.

Em trabalho realizado por Diaz et al (2011), verificou que a CE aumentou durante os meses de lactação, obtendo no estágio inicial de 5,41 mS/cm, intermediário de 5,81 mS/cm e final de 6,03 mS/cm.

Tabela 9. Comparação do teste de Condutividade Elétrica e pH entre as raças durante a curva de lactação

Análises	Condutividade Elétrica	pH
Raças		
Anglo Nubiana	5,72 ^b	6,57 ^a
Saanen	5,88 ^a	6,61 ^a
Período		
Out/15	5,64 ^b	6,73 ^{ab}
Nov/15	5,96 ^a	6,47 ^d
Dez/15	5,81 ^{ab}	6,74 ^a
Jan/16	5,98 ^a	6,61 ^{bc}
Fev/16	5,61 ^b	6,43 ^d
Mar/16	5,77 ^{ab}	6,53 ^{dc}
CV (%)	7,20	2,96

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey $Pr < 0,001$

Estudo realizado por Zaninelli et al. (2015), analisando o leite de cabra de glândulas mamárias com infecção observaram diferença significativa durante o estágio inicial, médio e final, com valores entre $10,9 \pm 0,1$, $14,8 \pm 0,3$ e $14,5 \pm 0,4$ mS/cm, respectivamente.

Para o pH, houve uma variação de 6,0 a 7,5, com média de 6,5. Esses resultados corroboram com os obtidos por Almeida et al. (2013), que ao analisarem o pH do leite de cabra proveniente de 11 fazendas observaram uma variação de 6,5 a 6,7 e média de 6,6.

Ao analisar o pH das amostras de leite de animais com infecção intramamária verificou-se média superior quando comparado com fêmeas saudáveis (6,71 e 6,58, respectivamente) (Tabela 7).

A Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000) objetivando regulamentar os padrões técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, estabeleceu o pH entre 6,6

a 6,8 como parâmetro indicativo de qualidade e saúde da glândula mamária. Valores superiores podem ser utilizados como indicativo de infecção intramamária. Partindo dessa premissa, adotou-se como valor médio de 6,7 para o teste de pH, em relação ao isolamento bacteriano.

Do leite analisado pelo teste de pH, 157 (67,67%) apresentaram inferiores a 6,7 e 75 (32,32%) e superiores a 6,7 (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição de *Staphylococcus* spp. encontrados no cultivo microbiológico de leite de cabras de acordo com o pH

Resultado microbiológico	pH		Total
	Acima de 6,7	Abaixo de 6,7	
<i>Staphylococcus</i> spp.	9 (12,0%)	9 (6,0%)	18
Sem isolamento bacteriano	66 (88,0%)	148 (94,0%)	214
TOTAL	75	157	232

Verificou-se que 157 amostras apresentaram pH inferior a 6,7, mas ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, constatou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. somente em 9 (6,0%) e nas amostras com pH superior a 6,7, das 75 amostras 66 (88,0%) não apresentaram isolamento (Tabela 10).

Durante uma infecção intramamária o leite torna-se mais alcalino, pois aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos permitindo a passagem de íons, principalmente de cloro, que eleva o pH, para valores próximos de 7 (sete), leite típico alcalino, sendo considerado como indicativo de mastite subclínica (CALLEFE e LANGONI, 2015).

11 Testes diagnósticos para mastite subclínica

Quando se utiliza um teste diagnóstico é de fundamental importância saber a probabilidade que um animal com resultado positivo seja realmente infectado, bem como um animal com resultado negativo seja de fato, não infectado.

Sabendo-se que o valor preditivo dos testes avaliados no presente estudo foi afetado pela sensibilidade, especificidade e prevalência baixa da mastite subclínica de 8% no rebanho, verificou-se que os testes apresentaram baixo VPP.

Quando a prevalência da doença é baixa, os testes tendem a apresentar baixo VPP e alto VPN. No presente estudo, por ter sido realizado em um rebanho experimental localizado em apenas uma região de Sobral deduz-se que os testes avaliados não foram

eficientes em diagnosticar animais com mastite subclínica, porém, é possível observar que o VPN para a CE, utilizando o ponto de corte de 5,20 mS/cm, foi alto.

Para o teste de CE em relação ao isolamento bacteriano, obteve sensibilidade de 100%, especificidade de 6,0%, VPP 8,2%, VPN 100% e acurácia de 13,3% (Tabela 11). A CE apresentou alta sensibilidade em identificar os animais doentes e acusou 100% dos animais que estavam verdadeiramente sadios (VPN), podendo ser utilizado como prova de triagem para mastite subclínica e associado ao exame microbiológico “padrão-ouro” para confirmar o diagnóstico.

Ao analisar o ponto de corte para CE de 5,20 mS/cm, Romero et al. (2012), observaram que para o estudo, foi considerado o melhor valor, obtendo sensibilidade e especificidade VPP e VPN de 70%, 50%, 58% e 65% respectivamente.

Diaz et al. (2011), ao analisarem o teste da CE em três fazendas diferentes (F1, F2 e F3), adotando um valor de 5,20 como ponto de corte, obtiveram sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para F1 (60%, 48%, 40% e 70%), F2 (80%, 20%, 48% e 55%) e F3 (95%, 20%, 30% e 90%) respectivamente.

Tabela 11. Sensibilidade (SE), especificidade (ES), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) dos testes utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica caprina

Testes	SE (%)	ES (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
CE	100,0	6,0	8,2	100,0	13,3
Cloretos	88,8	9,3	7,6	90,9	15,5
CMT	61,1	43,0	8,3	92,9	44,4
pH	50,0	69,1	12,0	94,2	67,6

Como o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) não preconiza teor de cloretos para o controle de qualidade do leite de cabra, no presente estudo, adotou-se como valor médio, 0,221 g/100 mL, conforme trabalho realizado por Diaz et al. (2012). Partindo desse princípio, para o teste de cloretos em relação ao isolamento bacteriano obteve-se sensibilidade e especificidade de 88,8% e 9,3%, respectivamente, e o VPP, VPN e acurácia de 7,6%, 90,9% e 15,5%, respectivamente.

O CMT em relação ao isolamento bacteriano no presente estudo apresentou sensibilidade de 61,1%, especificidade de 43,0%, Valor Preditivo Positivo (VPP) de 8,3%, Valor Preditivo Negativo (VPN) de 92,9% e acurácia de 44,4%. (Tabela 11).

Apesar do CMT ser validado para detecção de mastite subclínica na espécie bovina, para a espécie caprina o teste apresenta elevado número de falsos positivos e baixa eficiência, não sendo portanto, recomendado para o diagnóstico da enfermidade.

Durante o experimento realizado por Machado (2013), utilizando o teste CMT e classificando pelo grau de intensidade da mistura (leite + reagente) observou que o VPP para reação 2+ foi de 41,5% e para 3+ foi de 38,0%, valores considerados baixos, constatando que o teste é inviável para o diagnóstico de animais com mastite subclínica caprina.

Utilizando o ponto de corte de 6,7 para o pH em relação ao isolamento microbiológico, para o presente estudo observou-se sensibilidade de 50%, especificidade de 69,1%, VPP de 12%, VPN de 94,2% e acurácia de 67,6%.

CONCLUSÕES

O teste de CMT, por apresentar muitos resultados falso-positivos, não deve ser recomendado para o diagnóstico de cabras com mastite subclínica isoladamente;

O teste de cloretos não foi eficiente em identificar cabras com mastite subclínica;

A Condutividade Elétrica, por sua confiabilidade em determinar os animais verdadeiramente sadios (VPN), pode ser recomendada como prova de triagem para mastite subclínica;

O teste de pH foi influenciado pela presença de micro-organismos na glândula mamária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. F. et al. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.13-18, 2013.
- AMARAL, et al. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. **Ars Veterinária**, v.4, n.1, p.105-112, 1988.
- BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, v.19, supplement, p.15-85, 1990.
- BARCELLOS, T. F. S., SILVA, N., MARQUES JÚNIOR, A. P. mastite caprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte – Minas Gerais. I – Etiologia e sensibilidade a antibióticos, II – Métodos de diagnóstico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.1, p. 307-315, 1987.
- BARROS, G.C.; LEITÃO, C.H. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.12, n.1, p.45-48, 1992.
- BIANCHINI, S et al. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 4, n. 1, p.1-4, abr. 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 nov. 2000. Seção 1, p.23.
- CALLEFE, J. L. R.; LANGONI, H., **Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 22, p.151-162, 2015.
- CAVALCANTE, M. P. et al. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.19-26, 2013.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, n.1, p.145-153, 2007.
- COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p.03-09, 1998.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P. et al. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.297-300, 2011.
- DIAZ, J.R. et al. Analysis of the influence of variation factors on electrical conductivity of milk in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p.3885-3894, 2011. American Dairy Science Association.

- DIAZ, J.R. et al. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p.718-726, 2012. American Dairy Science Association.
- DULIN, A.M., PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v.45, n.5, p.435-439, 1982.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Estafilococos aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1315-1320, 2004.
- FASULKOV, I. et al. Ultrasound and histopathological investigations of experimentally induced *Estafilococos aureus* mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 129, n. 1, p.114-120, 2015.
- GARCIA, M. L. et al. Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.3, p.584-553, 1980.
- GUIMARÃES, M.P.M.P. et al. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para diagnóstico de mamite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, n.2, p.129-142, 1989.
- HIPOLITO, O. et al. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4. Ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1965. p. 26-37.
- LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.1, p.115-122, 2012.
- LIMA JÚNIOR, A. D., VIANNI, M. C. E., NADER FILHO, A. Estudo comparativo entre algumas características físico-químicas, celulares e bacteriológicas de leite de cabras reagentes e negativas ao California Mastitis Tests. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 46, n.3, p. 290-300,1994.
- Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams; Wilkins, 1976. 312p. 1976
- MACHADO, G. P. **Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscopia (Prescott e Breed, 1 91 0) do leite caprino mastítico**. 2013. 217 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MEDRONHO, R. A.; PEREZ, M. A. **Testes diagnósticos**. In: MEDRONHO, R. A. (ed.). Epidemiologia. Editora Atheneu, São Paulo-SP, 2002, p. 259-270.
- MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R.M.V. **Manual de soluções reagentes e solventes**. São Paulo: Edgar Blucher, 1972. 627 p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison : National Mastitis Council, 1996. 64p.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of goats**. Washington, D.C.: National Academy of Science, 1981. 91p.
- OLIVER, S. P. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona, Wis: National Mastitis Council, 2004. 47 p.
- PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal of Animal Science**, v.75, n.2, p.556-565, 1997.
- RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Equinos**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 1737p.
- ROMERO, G. et al. Analysis of the electrical conductivity in milking fractions as a mean for detecting and characterizing mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2-3, p.157-163, 2012.
- SALABERRY, S.R.S. et al. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p.336-244, 2016.
- SALABERRY, S. R. S. et al., Contagem de células somáticas e viabilidade celular em cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.. **Veterinária e Zootecnia**, v.22, n.3, p. 445-454, 2015.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiment sand observations leading to development of the California Mastitis Test. **American Journal of Veterinary Research**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS Institute Inc. 2009. **SAS OnlineDoc**. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- TANGORRA, F. M. et al. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: Results from a pilot study. **Small Ruminant Research**, v. 90, n. 1-3, p.109-113, 2010.
- THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 2nd ed. Cambridge: Blackwell, 1995. 479 p.
- TONIN, F.B.; NADER FILHO, A. Influência do estágio de lactação, hora e número de ordenhas sobre o teor de cloretos no leite caprino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p.64-67, fev. 2002.
- WEGNER, T. N.; STULL, J.W. Relation between mastitis test score mineral composition of milk, and blood electrolytes profiles in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.61, n.12, p.1755-1759, 1978.
- ZANINELLI, M. et al. Evaluation of the Fourier Frequency Spectrum Peaks of Milk Electrical Conductivity Signals as Indexes to Monitor the Dairy Goats' Health Status by On-Line Sensors. **Sensors**, v. 15, n. 8, p.20698-20716, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite ainda é motivo de preocupação por parte dos produtores de leite e o diagnóstico precoce dos animais infectados é fundamental para o controle da enfermidade no rebanho.

É importante que o produtor esteja atendo ao manejo sanitário do rebanho, a fim de evitar a disseminação da doença e prevenir os animais saudáveis, com isso, recomenda-se a adoção das Boas Práticas Agropecuárias (BPA).

A adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) visa favorecer as condições sanitárias do rebanho, melhorando a saúde dos animais e, conseqüentemente, a qualidade do leite.

O uso de programas de controle da mastite baseia-se principalmente no manejo dos animais, como:

- Higienização adequada das mãos dos ordenhadores, assim como dos equipamentos, utensílios e instalações;

- Estabelecimento de uma linha de ordenha, em que os animais sadios devem ser ordenhadas primeiro;

- Realização do teste da caneca telada do fundo escuro diariamente antes de cada ordenha, para retirada dos três primeiros jatos, procurando visualizar alterações macroscópicas do leite como grumos, pus e sangue que possam indicar mastite clínica;

- Pré-dipping em cada ordenha utilizando uma solução desinfetante com iodo a 0,5% e enxugá-los com papel toalha;

- Pós-dipping, após a ordenha, onde cada teto deve ser imerso em uma solução desinfetante à base de iodo 0,5% com glicerina;

- Fornecer alimento com o objetivo de manter os animais de pé após a ordenha, para que a esfíncter do teto se feche, evitando a entrada de micro-organismos para a glândula mamária;

- Higienização dos utensílios, equipamentos e instalações com água e desinfetantes apropriados para cada superfície de contato;

- Isolar do rebanho e tratar os animais com mastite clínica o mais breve possível.

É recomendado que o produtor realize exames periódicos no rebanho com o objetivo de identificar animais que estejam com infecção intramamária e o agente etiológico envolvido, auxiliando no tratamento adequado e na elaboração do plano de controle e prevenção da doença.

É de fundamental importância a conscientização dos produtores acerca do impacto da mastite clínica e subclínica no sistema de produção e na qualidade do leite. A prevenção ainda é a melhor forma de evitar a disseminação da doença no rebanho, com isso, é necessário que seja realizado treinamento com os funcionários sobre as boas práticas de higiene com o objetivo de contribuir na melhoria da qualidade do leite, tornar o sistema mais produtivo e produzir alimento seguro aos consumidores.