

UTILIZAÇÃO DO WHITESIDE MODIFICADO E CALIFORNIA MASTITIS TEST NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM BÚFALAS E SUA RELAÇÃO COM O EXAME MICROBIOLÓGICO.

(Use of the modified Whiteside and California Mastitis Test on the diagnosis of buffalo subclinical mastitis related to microbiological exam)

Mônica Valéria Vieira de OLIVEIRA¹, Rinaldo Aparecido MOTA¹, Andréa Alice da Fonseca OLIVEIRA^{2*}, Fernanda Silva de MEIRELLES¹ & Francisco Feliciano da SILVA²

¹EMBRAPA/Caprinos, ² Dept Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

Foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade dos testes *California Mastitis Test* (CMT) e *Whiteside Modificado* (WM) como métodos auxiliares no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas do Estado de Pernambuco. Estabeleceu-se, também, uma relação entre o estágio e o número de lactações frente à infecção da glândula mamária e a participação dos agentes etiológicos na enfermidade. Foram analisadas 196 amostras de leite procedentes de 49 búfalas em cinco propriedades rurais da Zona da Mata Sul. Destas, 139 (70,9%) amostras foram positivas ao exame microbiológico, isolando-se 76 (55%) amostras de *Staphylococcus* spp, sendo 18 (13%) de *Staphylococcus* coagulase positiva e 58 (42%) *Staphylococcus* coagulase negativa. Isolaram-se também 25 amostras de bastonetes (18%) Gram negativos, oito de (6%) *Streptococcus* spp e três (2,2%) de *Micrococcus* spp em culturas puras ou em associação, além de 45 amostras (32,4%) de *Bacillus* spp. A análise dos testes CMT e WM demonstraram baixa sensibilidade e especificidade quando comparados ao isolamento bacteriano. O número e o estágio da lactação não influenciaram no aparecimento da infecção na glândula mamária desta espécie.

PALAVRAS-CHAVE: mastite, diagnóstico, bubalinos.

ABSTRACT

One hundred and ninety six buffalo milk samples were analyzed from farms in the South region of Pernambuco State, Brazil. The sensibility and specificity of the California Mastitis Test (CMT) and the Modified Whiteside were studied as auxiliary methods in the diagnosis of subclinical mastitis. A relationship between the stage and the number of lactations regarding mammary infection was established. One hundred and thirty nine (70,9%) samples were positive in the microbiological exam, resulting in 76 samples of *Staphylococcus* spp. Fifty eight samples (42%) were classified as coagulase negative *Staphylococcus*. Other bacterias isolated were *Bacillus* spp (45/32,4%), Gram negative bacillus (25/18%), *Streptococcus* spp (8/6%) and *Micrococcus* spp (3/2,2%) in pure or mixed culture. The CMT and WM analysis showed low sensibility and specificity when compared to bacterial isolation. The number and stage of lactations did not influence on occurrence of the infection in the mammary gland of this species.

KEY WORDS: mastitis, diagnosis, bubaline.

*Autor para correspondência

²Embrapa – Caprinos, Estrada Sobral-Groaíras, Km 04,
Caixa Postal D-10, 62.011-970, Sobral, Ceará
e-mail: andrea@cnpq.embrapa.br.
Fone/fax: (88) 677 7055.

INTRODUÇÃO

A mastite envolve processos inflamatórios primários ou secundários do úbere, sendo mais freqüente em animais destinados à produção leiteira, podendo, todavia, ocorrer em todas as espécies animais (LANGONI et al., 1994). Esta enfermidade representa sério risco para saúde pública pelo fato da veiculação de agentes patogênicos ao homem por meio do leite mastítico (FAGLIARI et al., 1989).

As bactérias patogênicas mais freqüentemente isoladas em casos de mastite subclínica em bubalinos são *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Bacillus* spp (PRASAD et al., 1996). Na Índia, KAPUR & SINGH (1977), ao estudarem a eficácia de vários testes indiretos utilizados no diagnóstico de mastite sub-clínica em bovinos, caprinos e bubalinos, concluíram que para a última espécie, o California Mastitis Test (CMT) apresenta resultados mais satisfatórios.

VIANNI & NADER FILHO (1990), estudando a eficiência do CMT na estimativa do número de células somáticas do leite de búfalas, concluíram que o teste pode assumir papel fundamental no diagnóstico da forma sub-clínica da mastite bubalina, pois o conteúdo leucocitário do leite representa um bom indicador do estado sanitário da glândula mamária. Em bubalinos, são escassos os estudos empregando o Whiteside Modificado (WM) no auxílio ao diagnóstico da mastite subclínica, contudo, LAU et al. (1986) testaram quatro métodos indiretos para o diagnóstico auxiliar da mastite clínica e concluíram que WM, CMT e teor de cloretos conferem credibilidade ao diagnóstico.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da sensibilidade e especificidade do CMT e WM frente ao isolamento bacteriano na infecção sub-clínica do úbere de búfalas, bem como o estudo da etiologia da mastite na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 49 animais adultos, da raça Murrah, em diferentes estádios de lactação, procedentes de municípios do Estado de Pernambuco. Inicialmente procedeu-se a lavagem

das tetas com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto com álcool a 70%. Posteriormente foram submetidos ao teste de CMT, realizado e interpretado segundo técnica descrita por SCHALM & NOORLANDER (1957). Em seguida, as amostras de leite foram colhidas em tubos de ensaio estéreis, identificadas e encaminhadas em caixas isotérmicas sob refrigeração ao laboratório para exames microbiológicos. Os testes WM foram realizados e interpretados segundo técnica descrita por MURPHY & HANSON (1941).

As amostras de leite foram cultivadas em ágar contendo 8% de sangue bovino e ágar MacConkey para isolamento de enterobactérias, sendo incubadas a 37°C. A primeira leitura foi realizada às 24 h e a segunda às 48 h. Os agentes isolados foram identificados pelas características morfológicas de suas colônias e morfotintórias pela técnica de Gram. As amostras de *Staphylococcus* spp isoladas foram submetidas a prova de coagulase para diferenciação, segundo CARTER (1984).

A análise das amostras foi realizada segundo MARTIN et al. (1994) e objetivou pesquisar as principais bactérias isoladas da mastite sub-clínica bubalina, verificar a sensibilidade e a especificidade dos testes CMT e WM, bem como sua relação com o resultado do exame microbiológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Staphylococcus spp foi isolado em 76 amostras de leite, correspondendo a 55% do total de amostras cultivadas (Tab. 1). Destes, 18 (13%) foram positivos na prova de coagulase. Embora existam algumas divergências com relação à freqüência de bactérias isoladas no leite de búfalas com mastite sub-clínica relatada na literatura (KAPUR & SINGH, 1978; PARANJAPÉ & DAS, 1986; KAPUR et al., 1992; LANGONI et al., 1994; SAINI et al., 1994), *Staphylococcus* spp são os agentes mais isolados nesse tipo de infecção, sendo de grande importância epidemiológica nas mastites bubalinas. Os resultados obtidos neste estudo confirmam achados anteriores.

O isolamento de *Bacillus* spp no leite de búfalas foi relativamente alto (45 amostras), divergindo dos resultados obtidos por SAINI et al.

(1994) e LANGONI et al. (1994), os quais isolaram esses agentes em percentuais mais baixos, este fato é provavelmente explicado pelo modo de colheita do material e tipo de manejo realizado na propriedade. Embora sejam considerados agentes menos freqüentes das mastites, esses patógenos oportunistas ocupam a terceira posição das bactérias isoladas por PARANJAPE & DAS (1986) e podem assumir importância epidemiológica pois geralmente estão associados a lesões nas tetas (BLOOD & RADOSTITS, 1991), além de terem sido isolados de casos fatais em mastite bovina (JONES & TURNBULL, 1981).

Streptococcus spp foi um dos agentes menos isolado no leite de búfalas (6,0%), resultado contrário ao obtido por PARANJAPE & DAS (1986), que obtiveram maior número de isolamentos deste gênero. Possivelmente as condições de manejo dos animais e clima da região propiciam diferentes freqüências de isolamento.

Apesar das enterobactérias não terem sido classificadas neste estudo, é preocupante o índice relatado (18% de acordo com a Tab. 1), uma vez que são considerados agentes ambientais (CULLOR et al., 1994) e podem causar mastites agudas, algumas vezes fatais. Neste trabalho, o índice observado é condizente com as condições precárias de higiene que caracterizavam as instalações e a ordenha das propriedades visitadas.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a afirmação de DHILLON et al.

Tabela 1. Freqüência de microrganismos isolados no exame bacteriológico de amostras de leite bubalino em Recife, Pernambuco.

Microorganismos	N ^o	%
<i>Staphylococcus spp</i>	76	55,0
<i>Bacillus spp</i>	45	32,4
<i>Enterobacteriaceae</i>	25	18,0
<i>Streptococcus spp</i>	08	6,0
<i>Micrococcus spp</i>	03	2,2
Total	157*	114*

* Total de microrganismos considerando-se associações em mesmo quarto mamário.

(1995) que demonstraram ser os microrganismos isolados no leite de búfalas semelhantes àqueles comumente isolados em casos de mastites bovinas.

Todos os animais analisados apresentaram, no mínimo, um dos quartos mamários infectados, encontrando-se um total de 139 (70,9%) amostras de leite positivas e 57 (29,1%) negativas ao exame microbiológico. O resultado obtido é semelhante ao de KAPPUR et al. (1992), que obtiveram 74% das amostras de leite com mastite positivas ao exame bacteriológico e diferem dos resultados obtidos por CHANDER & BAXI (1975) quando relataram 35,44% de exame bacteriológico positivo em casos de mastites subclínica bubalina e dos dados de SYAAMASUNDAR & CHOUDHURI (1986) quando relataram a positividade de 37,93% aos exames bacteriológicos de mastite subclínica. Os resultados ainda diferem daqueles obtidos por LAU et al. (1986) que relataram índice de 23,5% de mastite subclínica na espécie. A elevada percentagem de amostras positivas ao exame bacteriológico (70,9%) neste estudo demonstrou uma alta freqüência da infecção nos rebanhos bubalinos, compatível com índice observados em bovinos, informação que difere de SAINI et al. (1994) que afirmaram serem os bubalinos menos susceptíveis à infecção subclínica que os bovinos.

Com relação ao número de quartos afetados, observou-se que apenas cinco búfalas (10,2%) apresentaram um quarto infectado, 16 (32,7%) dois quartos, 10 (20,4%) três quartos e 16 (36,7%) os quatro quartos infectados. Estes resultados discordam daqueles obtidos por CHANDER & BAXI (1975), KAPUR & SINGH (1978), LAU et al. (1986) e CHAND & BEHRA (1995), os quais verificaram que a grande maioria das infecções ocorriam em apenas um quarto da glândula mamária. A diferença observada nestes estudos está relacionada, possivelmente, ao tipo de manejo adotado, em particular no que se refere às medidas sanitárias adotadas no momento da ordenha. Durante a colheita das amostras, constatou-se que as búfalas não recebiam cuidados relativos à desinfecção no pré e pós "dipping", fato que pode ter favorecido a instalação e multiplicação de agentes infecciosos na glândula mamária.

Nas Tab. 2 e 3 apresentam-se as correlações entre os resultados obtidos no exame

Tabela 2. Resultados obtidos no exame microbiológico e no teste de CMT utilizando amostras de leite de búfalas aparentemente saudáveis em Recife, Pernambuco.

Exame microbiológico	CMT				Total	
	Positivo		Negativo			
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Positivo	37	26,6	102	73,4	139	100
Negativo	20	35,1	37	64,9	57	100
Total	57	29,1	139	70,9	196	100

N^o= número de amostras de leite.

microbiológico e os testes de diagnóstico indiretos (CMT e WM). Os resultados do teste CMT apresentaram elevado percentual de falsos negativos (73,4%), ou seja, casos com isolamento bacteriano positivo para os quais os resultados do CMT foram negativos, e um percentual razoável de resultados falsos positivos (35,1%), casos sem isolamento, mas com resultados positivos ao CMT.

A sensibilidade e a especificidade do teste CMT foram respectivamente de 26,6% e 64,9%. A sensibilidade apresentou valor muito baixo e a especificidade regular, onde observou-se que o CMT foi pouco eficiente como teste auxiliar para o diagnóstico das mastites sub-clínicas bacterianas em búfalas. Estes resultados discordam daqueles citados por KAPUR & SINGH (1977), SINGH & BAXI (1980) e VIANNI & NADER FILHO (1990), quando afirmaram que o CMT apresenta maior índice de acertos do que outros testes indiretos de

diagnóstico. SHUKLA & SUPEKAR (1983), estudando a mastite sub-clínica em búfalas, concordam também que o CMT é um teste eficiente, além de prático e sensível, verificação idêntica àquela relatada por SYAAMASUNDAR & CHOUDHURI (1986). SINGH et al. (1982) citaram que os testes indiretos, CMT e WM, apesar de não serem exatos, oferecem resultados satisfatórios nos exames de rotina para o diagnóstico das mastites subclínicas em búfalas.

Para o WM foram obtidos os seguintes resultados: sensibilidade de 45,3% e especificidade 64,9%. A sensibilidade para o teste WM foi um pouco mais elevada do que aquela observada para o CMT. A especificidade de 64,9% é considerada regular. Estes resultados diferem dos observados por BEHRA & DWIVEDI (1982) quando afirmaram que o teste indireto WM pode ser usado no diagnóstico da mastite subclínica em bubalinos

Tabela 3. Resultados obtidos nos exames microbiológicos e nos testes WM utilizando amostras de leite de búfalas aparentemente saudáveis em Recife, Pernambuco

Exame microbiológico	CMT				Total	
	Positivo		Negativo			
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Positivo	63	45,3	76	56,7	139	100
Negativo	20	35,1	37	64,9	57	100
Total	80	42,3	113	57,7	196	100

N^o= número de amostras de leite.

Tabela 4. Frequência de exames microbiológicos em relação ao número de lactações utilizando leite de búfalas aparentemente saudas em Recife, Pernambuco

Estádio de lactações	Exame microbiológico				Total	
	Positivo		Negativo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Estádio inicial (0-2 meses)	68	41,46	20	12,20	88	53,66
Estádio Intermediário (2-6 meses)	50	30,50	22	13,41	72	44,00
Estádio Final ¹ (acima de 6 meses)	04	2,44	-	-	4	2,44
Total	122	74,4	42	25,6	164	100

N⁰= número de amostras de leite.

por apresentar resultados satisfatórios, e corroboram com CHANDER & BAXI (1975), que ao estudarem os testes indiretos (WM e teor de cloretos) no diagnóstico da mastite bubalina, concluíram que estes conferem eficácia mediana. LAU et al. (1986), também concluíram que os testes mais adequados para o diagnóstico de mastites nesta espécie animal são WM, CMT e o teor de cloretos.

Nas Tab. 4 e 5 estão relacionados o número e o estágio de lactação e sua relação com o exame microbiológico do leite.

Um elevado número de búfalas com até três lactações, apresentaram exame microbiológico positivo. Aquelas com mais de três lactações também apresentaram um índice elevado de amostras bacteriologicamente positivas. Observou-se que o número de lactações não influenciou a frequência de isolamento bacteriano nas amostras de leite. Estas informações não coincidem com aquelas descritas por CHANDER & BAXI (1975),

SINGH & BAXI (1980), SAINI et al. (1994) ao afirmarem que a sétima e a oitava lactações são as mais críticas para o estabelecimento da mastite sub-clínica em búfalas. Outros autores como LAU et al. (1986) relataram que a quarta e a sexta lactações são as mais importantes no aparecimento da mastite sub-clínica.

Com relação à frequência de isolamento bacteriano relacionado ao estágio de lactação, observou-se que não houve diferença entre os mesmos, revelando a presença de microrganismos nos quartos mamários, independentemente do estágio de lactação em que os animais se encontravam. Estes resultados discordam dos resultados obtidos por SAINI et al. (1994) onde relataram que a mastite sub-clínica em búfalas é mais incidente no terço médio e final da lactação, estádios onde o esfíncter do teto encontra-se mais relaxado, o que favorece a entrada e o estabelecimento de microrganismos. Contudo, estes agentes podem

Tabela 5. Frequência de exames microbiológicos positivos em relação aos diferentes estádios de lactações, utilizando leite de búfalas aparentemente saudas em Recife, Pernambuco

Número de lactações	Exame microbiológico				Total	
	Positivo		Negativo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Até três	69	35,20	27	13,77	96	100
Acima de três	70	35,73	30	15,30	100	51,02
Total	139	70,93	57	29,07	196	100

¹ Para oito animais correspondente a 32 amostras não se dispõe desta informação.

ingressar de forma semelhante pelo canal galactóforo quando a ordenha não é realizada de forma higiênica como foi constatado neste estudo, sendo este fator, provavelmente, o mais importante no desencadeamento da mastite sub-clínica com alta frequência, conforme foi demonstrado em estudos realizados na espécie bovina por LANGONI et al. (1994).

CONCLUSÕES

Conclui-se que o isolamento bacteriano em amostras de leite de búfalas com glândulas mamárias aparentemente sadias é elevado na região estudada, considerando-se as baixas condições de higiene observadas. Os testes de CMT e WM apresentaram sensibilidade e especificidade medianas, interpretando-se com cautela o uso como ferramentas para o diagnóstico da infecção da glândula mamária nesta espécie. O número e o estágio de lactação não influenciaram na ocorrência de mastite sub-clínica nos animais do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHRA, G. D.; DWIVEDI, J. N. Comparison of mastitis screening test of milk and histopathology of udder of buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v. 59, p. 592 - 596, 1982.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. *Clínica Veterinária*, 7 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263p.
- CARTER, G. R. *Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária.*, São Paulo: Roca, 1984, p.515.
- CHANDER, S.; BAXI, K. K. A note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v. 52, p. 847 - 849, 1975.
- CHAND, P.; BEHRA, G. D. Factors influencing occurrence of mastitis genetic and environmental factors. *Indian Journal Dairy Science*, v. 48, p. 995-8, 1995.
- CULLOR, J. S.; TYLER, J.; SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. 2 ed., São Paulo: Manole, 1994, v. 2, p. 1041 - 1060.
- DHILLON, K. S.; SINGH, T. J.; SONDHAI, S. S. Milk bacteriology: Pre-and post- trisodium citrate mastitis treatment in buffaloes. *Indian Journal of Animal Science*, v. 65, p. 9-11, 1995.
- FAGLIARI, J. J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J. M. Estudo preliminar das mamites bovinas nos rebanhos leiteiros da Região de Ilha Solteira - SP. *Ciência Veterinária*, v. 10, p. 1-2, 1989.
- JONES, T. O.; TURNBULL, P. C. B. Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. *Veterinary Record*, v. 108, p. 271-274, 1981.
- KAPUR, M. P.; SINGH, R. P. Diagnosis of mastitis: a comparative study of four indirect tests. *Haryana Veterinary*, v. 26, p. 69 - 73, 1977.
- KAPUR, M. P.; SINGH, R. P. Studies on clinical cases of mastitis in cows, buffaloes and goats in Haryana State. *Indian Veterinary Journal*, v. 55, p. 803 - 806, 1978.
- KAPUR, M. P.; ANSHUSHARMA, BHARDWAL, R. M. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. *Buffalo Bulletin*, v.11, p. 44-7, 1992.
- LANGONI, H.; CARVALHO, M. C. M. de; MISCHAN, M. M. Incidência da mastite bovina relacionada com o estágio de lactação. *Revista Brasileira de Veterinária*, v. 16, p. 10-15, 1994.
- LAU, H. D.; SINGH, N. P.; HESS S. J. *Comparação de testes indiretos no diagnóstico de mastites subclínica em búfalas*. Belém: EMBRAPA - CPATU, 1986, p. 5 - 13. (Boletim de pesquisa, 77).
- MARTIN, S. W.; MEEK A. H.; WILLEBERG, P. Measurement of disease frequency and production. ***Veterinary Epidemiology: Principles and methods***. Iowa State University Press, Ames. p. 48 - 76, 1994.
- MURPHY, J. H.; HANSON, J. A modified Whiteside Test for detection of chronic bovine mastitis. *Cornell Veterinary*, v. 31, p. 47 - 55, 1941.
- PARANJAPE, V. L.; DAS, A. M. Mastitis among buffalo population of Bombay - A Bacteriological Report. *Indian Veterinary Journal*, v. 63, p. 438 441, 1986.
- PRASAD, R. V.; RATHMAN, K.; SHAH, D. G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira District, India. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 49, p. 441-7, 1996.
- SAINI, S. S.; SHARMA, J. K.; KWATRA, M. S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbreed cows and buffaloes in Punjab. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 47, p. 103-6, 1994.
- SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 130, p. 119 - 204, 1957.
- SHUKLA, P. C.; SUPEKAR, P. G. Incidence of subclinical mastitis buffaloes in Indore District.

Indian Journal of Animal Science, v.53, p. 196-200, 1983.

SINGH, K. B.; BAXI, K. K. Studies on the incidence and diagnosis of subclinical mastitis in milk animals. *Indian Veterinary Journal*, v. 57, p. 723 - 729, 1980.

SINGH, N.; SHARMA, V. K.; RAJANI, H. B. et al. Incidence economy and tests efficacy of subclinical mastitis in dairy animal. *Indian*

Veterinary Journal, v. 59, p. 693 -696, 1982.

SYAAMASUNDAR, N.; CHOUDHURI, P. C. A study on the prevalence subclinical mastitis in buffaloes. *Short Communications*, v. 25, p.353 - 354, 1986.

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

Recebido em:30.01.2004

Aceito em: 17.05.2004