

SP3920
P. 136

Importância do Diagnóstico Microbiológico para a Detecção da Mastite

A cultura de amostras de leite, coletadas assepticamente, tem sido usada para o diagnóstico da mastite, há muitos anos. A metodologia para sua realização permite o isolamento e identificação da maioria dos agentes da doença. O exame microbiológico é considerado o “padrão ouro” para a comparação de resultados, quando se avaliam outros testes de diagnóstico de mastite.

O exame microbiológico é um componente muito importante nos programas de investigação de mastite nos rebanhos. Sem o conhecimento dos microrganismos envolvidos, fica difícil avaliar corretamente o problema do rebanho, podendo somente ser feitas observações gerais. A identificação dos agentes indica as áreas dentro do sistema de produção que requerem atenção imediata. Os resultados podem ser usados para a adoção de medidas específicas de controle, identificação de patógenos emergentes, segregação e descarte de animais com infecção crônica, avaliação de eficácia de tratamentos e estabelecimento de padrões de susceptibilidade a antimicrobianos.

Diversos aspectos são fundamentais para que o resultado do exame microbiológico seja reprodutível e confiável. Dessa maneira, procedimentos padronizados foram publicados por International Dairy Federation (IDF, 1981) e National Mastitis Council (Oliver et al. 2004, Hogan et al. 2005). As padronizações detalham os procedimentos que devem ser seguidos, indicando, entre outros, o meio de cultivo a ser usado, volume do inóculo, temperatura, tempo de incubação e testes para identificação de patógenos. Outro aspecto extremamente importante para a garantia da confiabilidade do exame é a coleta e conservação das amostras de leite.

¹ Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito, Farmacêutica-Bioquímica, PhD em Microbiologia e Imunologia, Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite. Endereço: Rua Eugênio do Nascimento, 610, 36038-330, Juiz de Fora, MG. mavpaiva@cnpgl.embrapa.br

Coleta das amostras de leite

Tradicionalmente, a coleta de amostras de leite para a cultura é realizada antes da ordenha, mas pode ser feita também após a ordenha. As sensibilidades do isolamento de *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos e estreptococos foram maiores nas amostras coletadas antes da ordenha, que também apresentaram o maior número de amostras contaminadas. A especificidade da cultura das amostras obtidas após a ordenha foi maior (Sears et al. 1991). Não houve diferença na sensibilidade do isolamento de *Streptococcus agalactiae* entre amostras coletadas antes e após a ordenha (Dinsmore et al. 1991).

Para um diagnóstico seguro e correto, é muito importante que todas as amostras submetidas ao exame microbiológico sejam coletadas assepticamente, e em frascos estéreis. A contaminação das amostras de leite com microrganismos localizados na pele ou orifício dos tetos, nas mãos do operador ou microrganismos do ambiente, apresenta um problema para o diagnóstico. Por isso, é essencial fazer a anti-sepsia da superfície e do orifício dos tetos com algodão embebido em álcool a 70% e descartar os dois ou três primeiros jatos antes de coletar a amostra. A higienização deve começar pelos tetos mais distantes, seguindo-se a coleta pelos mais próximos. Imediatamente após a coleta, as amostras de leite devem ser colocadas em recipientes com gelo (4°C) e mantidas nestas condições até serem entregues no laboratório. Junto com as amostras, é importante informar a data da coleta, identificação do animal, se a amostra é de mastite clínica ou subclínica, se é composta ou de quarto mamário individual e identificação do quarto mamário. Se as amostras são de casos clínicos, deve-se informar também se foi feito algum tratamento anterior e há quanto tempo.

Congelamento de amostras

O congelamento tem sido uma prática freqüente para manter as amostras de leite, quando não for possível encaminhá-las imediatamente ao laboratório.

Estudos feitos para avaliar a ação do congelamento sobre patógenos da mastite mostraram que este procedimento pode afetar o isolamento de *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* e de espécies de *Nocardia* (Schukken et al. 1989; Oliver et al. 2004). O congelamento durante quatro, oito e 16 semanas não interferiu com o isolamento de *S. aureus* e estreptococos, incluindo *S.*

agalactiae, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. Porém, houve um aumento no isolamento de estafilococos coagulase-negativos (Schukken et al. 1989). Murdough et al. (1995) não encontraram alteração na viabilidade de *S. aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Corynebacterium bovis* e *E. coli*, durante seis semanas de congelamento. O número das bactérias foi contado em subamostras mantidas congeladas durante o período e não houve variação estatisticamente significativa nas contagens. Essa avaliação foi feita com amostras de leite coletadas de 45 quartos mamários de vacas em lactação com CCS $\geq 5 \times 10^5$ por ml.

Considerando esses resultados, o congelamento é recomendado por períodos curtos, de até quatro semanas. Mesmo sabendo que pode haver interferência na recuperação de determinados patógenos, este procedimento é preferível ao desenvolvimento de microrganismos contaminantes, que darão origem a um resultado equivocado. No laboratório, o aumento do volume do inóculo pode ser usado, para aumentar a sensibilidade da cultura das amostras congeladas.

Tipos de amostras

As amostras de leite para exame microbiológico podem ser coletadas de quartos mamários individuais, de todos os quartos mamários do mesmo animal (amostra composta), de grupos de animais ou do leite total do rebanho.

A cultura de quartos mamários individuais permite o conhecimento do *status* microbiológico do rebanho (Brito et al. 1999), porém apresenta a desvantagem do custo elevado dos exames.

Uma alternativa para a redução dos custos é a cultura de amostras compostas de todos os quartos do mesmo animal. Nesse caso, deve-se ter o cuidado de obter quantidades iguais de leite de cada glândula, porque o número de glândulas infectadas por vaca influencia a sensibilidade da cultura. A sensibilidade relativa para o isolamento de *S. aureus* de amostras compostas de vacas com somente uma glândula infectada foi de 58%. Quando as quatro glândulas estavam infectadas foi de 89% (Lam et al. 1996). Amostras compostas tiveram alta sensibilidade para o isolamento de *S. agalactiae* (Dinsmore et al. 1991), mas menor sensibilidade para detecção de *S. aureus* (Lam et al. 1996).

O número de animais e/ou amostras a serem analisadas depende das questões a serem respondidas em cada rebanho (Kelton & Godkin, 2000). Rebanhos com contagens de células somáticas (CCS) elevadas, geralmente

apresentam alta prevalência de infecções subclínicas. Nestes rebanhos, a avaliação das infecções presentes pode ser feita pela cultura de uma amostragem de quartos mamários com base na CCS. O custo com exames microbiológicos é reduzido, porém pode não identificar animais infectados por *S. aureus*, que estejam eliminando poucas bactérias (Sears et al. 1990). Em rebanhos com baixa CCS, o exame microbiológico do leite de todos os casos clínicos, antes de iniciar o tratamento, fornecerá indicações sobre os problemas do rebanho, que estão contribuindo para a ocorrência de mastite.

Procedimentos para a cultura

O meio de cultura recomendado para a inoculação das amostras de leite é o ágar sangue (Ágar Soja Trypticaseína, TSA, com 5% de sangue desfibrinado de carneiro). Este é um meio sólido, não-seletivo que permite o isolamento da maioria dos patógenos da mastite e também, a diferenciação adequada das colônias. Às vezes, há necessidade de se usar hemácias lavadas na composição do meio, para a observação da hemólise de *S. aureus*. Isto porque pode haver anticorpos anti-alfa e/ou anti-beta hemolisinas no soro do animal doador do sangue, prejudicando a avaliação das colônias. Pode-se acrescentar 0,1% de esculina e beta-hemolisina de *S. aureus* ao ágar sangue. Desse modo obtêm-se os resultados de hidrólise da esculina e do teste de CAMP no isolamento primário, agilizando a identificação de *S. agalactiae* (Hogan et al. 2005).

Meios seletivos podem ser usados quando necessário. Alguns laboratórios usam o meio Edwards modificado (Oxoid) ou TKT (Merck), que contém sulfato de tálio, cristal violeta e esculina, seletivos para *S. agalactiae* e outros estreptococos. Embora seja um custo adicional, facilita a identificação rápida presuntiva de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*. Quando se suspeita de mastite causada por micoplasma deve-se usar o meio próprio para inoculação das amostras (Hogan et al. 2005).

No laboratório, deve-se examinar primeiro o aspecto de cada amostra e, em seguida, proceder à cultura. Amostras que foram congeladas devem ser descongeladas a temperatura ambiente. Todas as amostras de leite devem ser completamente homogêneas antes de serem inoculadas no meio de cultura.

Para a rotina dos exames microbiológicos recomenda-se a inoculação de 0,01 ml (10 µl) de leite nas placas de ágar sangue, o que é feito, geralmente, com alças descartáveis calibradas. Volumes maiores, como 0,05 ml (50 µl) e 0,1 ml (100

μl), podem ser retirados com pipetador automático e espalhados com alça de inoculação. A superfície da placa a ser espalhada dependerá do volume inoculado. Volumes de 10 μl podem ser espalhados em um quadrante das placas de 100 mm de diâmetro, 50 μl , em metade da placa e 100 μl , em toda placa. As amostras devem ser espalhadas de modo a se obter pelo menos uma colônia bem isolada. Após inoculação as placas de ágar sangue são incubadas entre 35 e 37°C. Nessa faixa de temperatura crescem todos os agentes da mastite. Havendo suspeita de algum microrganismo que requer incubação em temperatura diferente, em anaerobiose ou ambiente de CO_2 , essas condições devem ser consideradas.

Interpretação dos resultados

As placas de ágar sangue devem ser examinadas cuidadosamente para observação das características das colônias que se desenvolveram, após 18 a 24 horas e após 48 horas de incubação. Deve-se anotar o número, a forma, o tamanho e o aspecto das colônias, presença de hemólise, produção de pigmento e se o crescimento apresenta somente um tipo ou diferentes tipos de colônias. É necessário examinar e interpretar as placas com cuidado por causa dos microrganismos contaminantes comuns que surgem nos exames, especialmente quando as condições de coleta e transporte das amostras não são adequadas. Os contaminantes geralmente se desenvolvem mais rápido e interferem com o resultado do diagnóstico. Considera-se que houve problema de contaminação na coleta da amostra se três ou mais tipos diferentes de colônias são isoladas. Microrganismos do ambiente devem ser isolados em cultura pura para serem considerados responsáveis pela infecção. Se há problema de contaminação deve-se examinar uma nova amostra para a conclusão do diagnóstico.

Após o isolamento inicial, a observação de esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar a morfologia e a coloração, é o primeiro passo para começar a identificação. A separação de microrganismos em Gram-positivos e Gram-negativos pode ser feita também usando KOH a 3%. Em seguida, uma colônia isolada deve ser transferida para outro meio, por exemplo, TSA ou ágar Brain Heart Infusion (BHI), para daí serem submetidas aos testes de identificação (Oliver et al. 2004, Hogan et al. 2005). Outro teste preliminar que deve ser feito para diferenciar os cocos Gram-positivos é a produção de catalase. Entre os catalase-negativos está o grupo dos estreptococos e

enterococos e nos catalase-positivos estão os estafilococos. A partir desse conjunto de testes iniciais, os microrganismos podem ser separados em grupos para a identificação mais detalhada. Testes simplificados para a rotina do diagnóstico são discutidos abaixo.

O teste de produção da coagulase em tubo deve ser feito para diferenciar os estafilococos coagulase-positivos. São três espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos de interesse na etiologia da mastite bovina: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Um teste adicional recomendado para diferenciar as espécies coagulase-positivas é a produção de acetoina a partir de glicose ou piruvato, positivo para *S. aureus* e negativo para *S. intermedius* e *S. hyicus*. Testes simplificados para diferenciar essas três espécies foram avaliados por Brito et al. (2002b). A correta identificação de *S. aureus* é muito importante para o controle da mastite porque este é um agente contagioso, que se dissemina rapidamente entre os animais do rebanho, e causa, predominantemente, infecções subclínicas de longa duração e infecções crônicas, com casos clínicos periódicos.

A classificação dos microrganismos do grupo dos cocos Gram-positivos, catalase-negativos, passou por grandes mudanças nos últimos anos (Santos et al. 2007). Os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* são mais comumente isolados de mastite bovina, e diversas espécies de *Streptococcus* são de importância na etiologia da doença. A identificação completa de *S. agalactiae* é obrigatória no exame microbiológico da mastite, porque esse microrganismo é o único que pode ser erradicado dos rebanhos leiteiros. Adicionalmente, é um agente contagioso, que se dissemina com muita facilidade entre os quartos mamários de um mesmo animal e entre os animais do rebanho, causando aumento das células somáticas e redução na produção de leite. Um conjunto simplificado de testes pode ser usado para identificar as espécies *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae* e o gênero *Enterococcus* (Brito & Brito 1999). Este conjunto inclui o teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), hidrólise da esculina, crescimento em meio de bile-esculina, hidrólise do hipurato de sódio e crescimento em presença de 6,5% de NaCl.

Os bastonetes ou coco-bacilos Gram-negativos podem ser divididos em dois grupos, os oxidase-positivos e os oxidase-negativos. No primeiro grupo estão as bactérias do gênero *Pseudomonas*, cuja identificação é facilitada pela observação da produção de pigmentos. No segundo grupo, estão os coliformes, que incluem *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp e *Proteus* spp. Outra bactéria Gram-negativa, que ocasionalmente aparece em casos de mastite clínica é *Pasteurella multocida*. Testes que podem ser usados para diferenciar esse grupo incluem:

mobilidade, produção de indol, de urease e de H₂S, VM, VP, utilização do citrato e da lactose e descarboxilação da lisina e ornitina. A observação do metabolismo oxidativo ou fermentativo no meio de Hugh-Leifson, as características do crescimento em ágar TSI (Triple Sugar Iron) e a observação do crescimento em ágar MacConkey completam os testes simplificados para esse grupo.

Bactérias com morfologia de difteroides na coloração de Gram (bastonetes Gram-positivos pequenos, não esporulados e pleomórficos), como *C. bovis* e *A. pyogenes* podem ser identificados por meio dos testes de produção de catalase, de urease, liquefação da gelatina, presença de hemólise e requerimento de ácidos graxos insaturados para crescimento. O teste de liquefação do meio do soro coagulado (Löffler) é de grande utilidade para identificação de *A. pyogenes*.

A caracterização de algas do gênero *Prototheca* e de leveduras pode ser feita observando esfregaços corados pelo Gram. A visualização de *Prototheca* é facilitada em esfregaços preparados a fresco, que permitem observar mais claramente as células características do microrganismo. Se houver necessidade, testes podem ser realizados para identificação (Brito & Veiga 1997).

Diversos outros microrganismos podem ainda ser isolados na rotina do diagnóstico microbiológico da mastite. Além da literatura padronizada já citada anteriormente (IDF 1981, Oliver et al. 2004, Hogan et al. 2005), o laboratório de diagnóstico microbiológico veterinário, deve ter disponível, compêndios de referência para que testes adicionais sejam executados, sempre que houver dúvidas na identificação. A correta identificação dos microrganismos é muito importante para o controle da mastite e um resultado confiável, é um forte aliado para o veterinário que trabalha no campo.

Amostras falso-positivas e falso-negativas

Três tipos de resultados são encontrados após a cultura das amostras de leite: (1) resultado negativo, isto é, ausência de crescimento microbiano, (2) resultado positivo, isto é, crescimento em cultura pura de um tipo de microrganismo e (3) crescimento de múltiplas colônias, indicando contaminação da amostra.

Um problema encontrado no exame microbiológico é a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos. Um resultado falso-positivo ocorre quando um patógeno é isolado em cultura pura de um quarto mamário que não está infectado. Esse tipo de resultado pode ocorrer com todos os patógenos, incluindo *S. aureus* e *S. agalactiae*. A frequência de falso-positivos

aumenta com o número de quartos infectados no rebanho, e pode resultar de contaminação no momento da coleta, ou problema na identificação da amostra. De maneira semelhante, a frequência de amostras falso-positivas por patógenos do ambiente aumenta na medida em que a contaminação ambiental aumenta (Hogan et al. 2005).

Amostras falso-negativas são aquelas em que não foi possível o isolamento microbiano, mas o quarto mamário está infectado. Resultado falso-negativo é muitas vezes encontrado em amostras de casos clínicos. De 824 amostras de leite coletadas de casos clínicos de mastite, 18% resultaram negativas na cultura (Bartlett et al. 1992). Nesse estudo, os principais agentes isolados foram coliformes (20%) e estreptococos do ambiente (26%). O número de coliformes eliminado nas infecções intramamárias é, geralmente, baixo, dificultando a detecção pelos métodos de rotina. Em alguns casos, a infecção pode já ter sido eliminada, mas persiste uma elevada contagem de células, porque a cura das lesões não se completou e os leucócitos continuam se movimentando em direção à glândula mamária. Por outro lado, resultados falso-positivos por essas bactérias podem ocorrer devido a sua ampla distribuição no ambiente (Erskine & Eberhart 1988).

As principais razões citadas para os resultados falso-negativos são: (1) baixo número de microrganismos presentes na amostra, (2) necessidade de meios de cultivo ou procedimentos especiais para o isolamento, (3) presença de inibidores na amostra e (4) morte do microrganismo devido a problemas no acondicionamento ou transporte da amostra (Hogan et al. 2005).

Sears et al. (1990) mostraram que glândulas mamárias infectadas com *S. aureus*, apresentam um padrão de cíclico de eliminação da bactéria no leite, em que altos e baixos números se alternam. A probabilidade de uma única amostra permitir o isolamento de *S. aureus* foi de 74,5%. O exame de duas e três amostras consecutivas aumenta essa probabilidade para 94% e 98%, respectivamente. A partir desse resultado, há uma recomendação geral de se examinar duas ou três amostras de leite consecutivas para aumentar a sensibilidade da cultura de vacas infectadas por *S. aureus*, principalmente aquelas com baixas contagens de células somáticas.

No caso de *S. agalactiae*, animais com infecção crônica geralmente eliminam grande número da bactéria no leite, mas há ocasiões quando poucas bactérias são eliminadas e a cultura de uma única amostra pode ser negativa (Dinsmore et al. 1991). A coleta de amostras repetidas pode ser necessária para detectar todos os animais infectados no rebanho.

Diversos estudos foram feitos para avaliação de procedimentos que

reduziriam os resultados falso-negativos do exame microbiológico da mastite. O aumento do volume do inóculo de amostras de mastite clínica, para 100 µl aumentou a sensibilidade do isolamento para diversos microrganismos, incluindo de estreptococos do ambiente e de coliformes. A pré-incubação das amostras de leite por 18 horas a 37°C aumentou significativamente o número de contaminações, o que desaconselha esse procedimento (Dinsmore et al. 1992). Para *S. aureus*, além da coleta de amostras repetidas (Sears et al. 1990), encontrou-se que aumentando o volume do inóculo para 100µl, aumentou a sensibilidade de amostras compostas (Lam et al. 1996), mas houve mais problema de contaminação das culturas. Zecconi et al. (1997) relataram 94% de aumento na recuperação de *S. aureus* a partir do sedimento de amostras de leite centrifugadas. O maior aumento de culturas positivas foi de amostras coletadas no período de 7 a 10 dias após o parto. Esse achado pode contribuir para a identificação precoce de vacas infectadas por esse agente. O aumento foi significativo também para amostras coletadas após o tratamento. Sol et al. (2002) avaliaram o efeito do congelamento durante 24 horas e o pré-cultivo em caldo de amostras de mastite subclínica. Para *S. aureus*, as porcentagens de isolamento foram maiores após enriquecimento em caldo e após congelamento. O isolamento de *S. uberis* não apresentou diferença entre os três métodos e o isolamento de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* foi maior pelo método tradicional (sem enriquecimento e inóculo de 10µl).

Outro critério que tem sido adotado em trabalhos de pesquisa da mastite bovina é a coleta de duas amostras em duplicata, isto é, coletadas imediatamente uma após a outra. Foi encontrada concordância geral de 98,1% entre os pares dessas amostras, sendo maior entre os patógenos contagiosos. Esta foi de 96,4% para *S. agalactiae* e de 94,2% para *S. aureus*. Para outros estreptococos foi de 81,6% e para coliformes, de 55,6% (Erskine & Eberhart 1988).

No diagnóstico de infecções intramamárias, o critério mais amplamente aceito, é o isolamento do mesmo microrganismo de duas amostras coletadas em duplicata, ou de duas, em três amostras consecutivas, obtidas pelo menos com um dia de intervalo entre elas. O menor intervalo entre coletas feitas no mesmo dia que causou menor impacto na sensibilidade de isolamento de *S. aureus* foi de 0,5 dia, e o intervalo de três dias foi o que mostrou maior sensibilidade (Buelow et al. 1996). Na rotina do diagnóstico, culturas múltiplas não são possíveis para a maioria dos rebanhos, porque aumentam muito o custo dos exames. Entretanto, nos trabalhos de pesquisa, esse procedimento deve ser seguido, de modo a se obter maior confiabilidade dos resultados.

Amostras contaminadas

A contaminação das amostras de leite é um dos principais problemas na identificação dos patógenos da mastite no exame microbiológico. Os microrganismos contaminantes podem estar presentes na pele dos animais ou do úbere, ou mesmo na pele do indivíduo que coleta as amostras. Muitos desses microrganismos podem ser agentes da mastite e o isolamento deles pode dificultar a interpretação da cultura. Quando se isola um microrganismo do ambiente juntamente com outros, nunca se pode dizer com segurança se ele é realmente o agente da mastite. Um microrganismo do ambiente pode ser considerado como causa de uma infecção intramamária quando ele é isolado: (1) em cultura pura de uma única amostra, (2) de amostras duplas obtidas na mesma coleta, ou, (3) de duas ou três amostras consecutivas coletadas em intervalos não superiores a 30 dias.

Quando se usam os cuidados de assepsia para coleta de amostras é possível reduzir a contaminação com as bactérias presentes na superfície dos tetos, no orifício dos tetos, ou bactérias do ambiente. Vangroenweghe et al. (2001) comparou a contaminação de amostras de leite coletadas manualmente, com cuidados de assepsia e amostras coletadas através de cânula intramamária, que permitiu a coleta estéril do leite. Não houve diferença significativa entre a coleta manual e a coleta estéril com respeito a contaminação bacteriana das amostras.

Antibiograma

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou sensibilidade de uma amostra bacteriana específica a vários antimicrobianos (antibióticos ou quimioterápicos). Os resultados do antibiograma são interpretados e usados para tomar decisões sobre tratamento.

Os métodos usados para realização do antibiograma baseiam-se na difusão do antimicrobiano a partir de discos colocados sobre a camada de ágar ou no contato direto da suspensão padronizada da bactéria com diferentes concentrações do antimicrobiano, incorporadas em meios de cultivo sólido ou líquido. Este último permite determinar a menor concentração do antimicrobiano que inibe completamente o crescimento da bactéria (CMI: Concentração Mínima Inibitória). Como são mais elaborados, são menos empregados na rotina. Contudo, sistemas comerciais que permitem determinar

a CMI, são disponíveis no mercado, e têm sido usados para os agentes da mastite, em alguns laboratórios especializados.

O teste mais usado na rotina laboratorial dos trabalhos de mastite é o da difusão do antimicrobiano. Nesta técnica, a suspensão padronizada do organismo em teste é espalhada na superfície do meio de cultura. O antimicrobiano, impregnado em um disco de papel de filtro, quando colocado sobre o meio de cultura inoculado com a suspensão bacteriana, difunde-se, formando um gradiente de concentração. A velocidade de difusão é produto da interação entre as moléculas do agente antimicrobiano e o meio. Portanto, o teste pode ser influenciado pela quantidade do antimicrobiano nos discos, densidade do gel de ágar, difusibilidade do agente em solução aquosa, força iônica da composição do meio de cultura e profundidade do ágar.

Este é um processo dinâmico, à medida que a incubação prossegue, o gradiente de concentração se altera e ao mesmo tempo acontece a multiplicação bacteriana. A zona de inibição do crescimento bacteriano que resulta é diretamente proporcional à susceptibilidade do microrganismo, desde que todas as variáveis que afetam a difusão da droga sejam mantidas constantes. A concentração do inóculo também é uma variável que afeta a zona de inibição. Com inóculos mais concentrados, há maior chance de haver crescimento visível antes que o antimicrobiano possa se difundir ao redor do disco. Se o inóculo é pouco concentrado, ocorre o contrário.

Desse modo, para se obter resultados confiáveis no teste de difusão em ágar, é muito importante que os detalhes técnicos deste procedimento sejam cuidadosamente padronizados e controlados. É recomendado seguir a metodologia padronizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Institute, anteriormente chamado NCCLS) que é a Instituição que padroniza o método empregado em medicina humana. O Documento M31-A3 (terceira edição), é uma padronização feita especialmente para testes de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias de origem animal (CLSI, 2008). Além de seguir rigorosamente o detalhamento técnico descrito é necessário avaliar periodicamente os procedimentos técnicos do laboratório, empregando as bactérias recomendadas para controle, que possuem halos de inibição conhecidos para diferentes antibióticos.

O método de antibiograma pela difusão do antibiótico na superfície de placas de ágar é recomendado principalmente para bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, do grupo coliforme e espécies relacionadas. Não pode ser usado para organismos que crescem lentamente, como *A. pyogenes*.

Cultura do leite do tanque

O exame microbiológico do leite total da fazenda (leite do tanque) tem sido muito difundido com o objetivo de avaliação da qualidade do leite e monitoramento do *status* da saúde do úbere do rebanho. Além da contagem total de bactérias aeróbicas do leite, grupos específicos de microrganismos são examinados, incluindo os patógenos contagiosos da mastite, *S. aureus* e *S. agalactiae* (Brito et al. 1998; Brito et al. 2002a). A detecção de patógenos contagiosos da mastite é feita empregando-se meios seletivos e indicadores para *S. agalactiae* (TKT ou Edwards modificado) e *S. aureus* (ágar sal manitol ou Vogel-Johnson). Outros meios também incluídos são ágar MacConkey para detecção de coliformes e bactérias Gram-negativas e Hayflick modificado para detecção de *Mycoplasma*.

Os procedimentos para o exame, coleta de amostras, volume a ser inoculado e número de amostras que devem ser examinadas são descritos em Oliver et al. (2004) e Hogan et al. (2005). Devido às variações na eliminação dos patógenos contagiosos, há necessidade de se coletar várias amostras do leite do tanque (três ou quatro), em dias diferentes. Quando presente, *S. agalactiae* e *Mycoplasma* são isolados com mais facilidade do que *S. aureus*.

A presença de microrganismos do ambiente deve ser cuidadosamente interpretada neste teste, porque nunca será possível afirmar com certeza que esses microrganismos originaram de infecção intramamária. O número de coliformes mais provavelmente, se relaciona com contaminação da pele dos tetos no momento da ordenha. O mesmo pode acontecer com estreptococos do ambiente. Quando números elevados de microrganismos do ambiente são isolados indica que devem ser revistos os procedimentos de higienização dos tetos antes da ordenha. Problemas relacionados à higiene da ordenha, refrigeração do leite e de limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, podem ser detectados quando se examinam outros grupos de microrganismos, como psicrótróficos e termodúricos. O número dos microrganismos psicrótróficos pode ser estimado pela contagem total de bactérias após a incubação do leite a 12,8°C, durante 18 horas e comparação do resultado com a contagem total de microrganismos aeróbicos feita antes da incubação. Microrganismos termodúricos podem ser avaliados pela contagem total de bactérias depois aquecer a 62,8°C durante 30 minutos no laboratório. Essas duas análises são chamadas em inglês de *Preliminary incubation count* (PIC) e *Lab pasteurized count* (LPC), respectivamente.

Conclusão

O exame microbiológico de amostras de leite para diagnóstico da mastite tem sido uma ferramenta muito importante no controle da doença. Uma vantagem da cultura é que além do isolamento e identificação dos agentes da doença, pode-se realizar o antibiograma das bactérias isoladas. Entretanto, aspectos relacionados à sensibilidade do método para detecção de patógenos quando eliminados em baixo número, e o tempo de três a quatro dias para obter o resultado final, têm motivado algumas modificações nos procedimentos do exame microbiológico. Métodos que auxiliam na rápida identificação dos agentes isolados, como aglutinação em látex para identificação de *S. aureus* e testes fenotípicos miniaturizados (ex. API) baseados nas características fenotípicas, têm sido empregados. Desse modo abrevia-se o tempo e reduz-se a mão-de-obra para preparo dos testes de identificação.

Mais recentemente, métodos moleculares têm sido aplicados no diagnóstico microbiológico da mastite. Esses se baseiam na amplificação de fragmentos específicos do DNA bacteriano, pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para a identificação de bactérias já isoladas, ou a diferenciação de espécies, pela análise dos fragmentos (Santos et al. 2007). Esse último procedimento foi aplicado na diferenciação de espécies de estreptococos, estafilococos coagulase-negativos e de *Arcamobacterium*. PCR em tempo real elimina a etapa de eletroforese e permite reduzir ainda mais o tempo de análise. Um kit comercial, empregando PCR em tempo real foi apresentado no XXV Congresso Mundial de Buiatria, em Budapeste, julho/2008. Este kit permite detectar onze patógenos primários da mastite e a resistência a penicilina pela detecção do gene da enzima beta-lactamase.

Técnicas moleculares de genotipagem têm sido também usadas na microbiologia da mastite, para avaliar a diversidade entre espécies de determinado patógeno. Esses estudos são relevantes para a compreensão da epidemiologia e patogênese da doença. Com essa finalidade, se empregam as técnicas de ribotipagem, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) e RAPD (Random Amplification of Polimorphic DNA) (Duarte et al. 2004).

Esses novos métodos moleculares precisam ser validados e estarem disponíveis, a baixo custo para serem amplamente usados. Entretanto, eles abrem novas perspectivas para a detecção dos patógenos da mastite, pela possibilidade de uso em conjunto com os métodos microbiológicos tradicionais

ou isoladamente. Desse modo, podem contribuir significativamente para reduzir o tempo necessário para o diagnóstico e aumentar a sensibilidade da cultura.

Referências

1. BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y.; LANCE, S.E.; HEIDER, L.E. Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, v. 12, p.59-71, 1992.
2. 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).
3. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v. 57, n. 327, p. 83-88, 2002a.
4. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.
5. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pes. Vet. Bras.*, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.
6. BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, v. 32, p. 79-82, 2002b.
7. BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, V.M.O. Mastite clínica causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. *Ciência Rural*, v. 7, n. 4, p. 681-684, 1997.
8. BUELOW, K.L.; THOMAS, C.B.; GOODGER, W.J.; NORDLUND, K.V.; COLLINS, M.T. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v. 26, p. 1-8, 1996.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - 3 ed. CLSI document M31-A3. v. 28, n. 8, 2008. 116p.
10. DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS,

- P.M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 75, p. 2706-2712, 1992.
11. DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M.; SCHULTE, H.F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 1521-1526, 1991.
12. DUARTE, R.S.; MIRANDA, O.P.; BELLEI, B.C.; BRITO, M.A.V.P.; TEIXEIRA, L.M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, 2004.
13. ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J. Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 71, p. 854-856, 1988.
14. HOGAN, J.S.; GONZÁLEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. Laboratory handbook on bovine mastitis. Verona: National Mastitis Council. 2005, 222p.
15. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. Brussels, 1981. 27p. (Bulletin 132).
16. KELTON, D.F.; GODKIN, M.A. Mastitis culture programs for dairy herds. In: 39 National Mastitis Council Annual Meeting, Atlanta. Proceedings... 2000. p. 54-62.
17. LAM, T.J.G.M.; van WUIJCKHUISE, L.A.; FRANKEN, P.; MORSELT, M.L.; HARTMAN, E.G.; SCHUKKEN, Y.H. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 208, p. 1705-1708, 1996.
18. MURDOUGH, P.A.; DEITZ, K.E.; PANKEY, J.W. Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 79, p. 334-336, 1995.
19. OLIVER, S.P.; GONZÁLEZ, R.N.; HOGAN, J.S.; JAYARAO, B.M.; OWENS, W.E. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4 ed. Verona, WI: National Mastitis Council. 2004. 47p.
20. SANTOS, E.M.P.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.
21. SANTOS, O.C.S.; BARROS, E.M.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, M.C.F.;

- SANTOS, K.R.N.; DEMARVAL, M.G. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. *Vet. Microbiol.*, v. 130, p. 134-140, 2008.
22. SCHUKKEN, Y.H.; SMIT, J.A.H.; GROMMERS, F.J.; VANDEGEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 1900-1906, 1989.
23. SEARS, P.M.; SMIT, B.S.; ENGLISH, P.B.; HERER, P.S.; GONZALEZ, R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 73, p. 2785-2789, 1990.
24. SEARS, P.M.; WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; HANCOCK, D.D. Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for the diagnosis of bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 4183-4188, 1991.
25. SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; HARTMAN, E.; BARKEMA, H.W. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Vet. Microbiol.*, v. 85, p. 241-249, 2002.
26. VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; MEHRZAD, J.; BURVENICH, C. Effect of sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk. *Vet. Res.*, v. 32, p. 565-579, 2001.
27. ZECCONI, A.; PICCININI, R.; ZEPPONI, A.; RUFFO, G. Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 3058-3063, 1997.

Mirna Lúcia Gigante¹
Marcela de Rezende Costa¹

Influência das Células Somáticas nas Propriedades Tecnológicas do Leite e Derivados

Células somáticas são derivadas do animal e estão presentes naturalmente no leite. Dentre essas, encontram-se células de descamação, devido ao processo natural de renovação do epitélio da glândula mamária, e células brancas de defesa, derivadas da circulação sanguínea do animal. Em um animal sadio, o principal tipo celular encontrado são as células epiteliais, representando em torno de 80% do total. Quando ocorre uma infecção do úbere por patógenos, a contagem de células somáticas aumenta, principalmente pela grande quantidade de células de defesa, como macrófagos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares, que migram do sangue para o úbere para combater os invasores, e, nessa situação, elas passam a representar a maioria das células somáticas do leite. Assim, o aumento na contagem de células somáticas, acompanhado da alteração da proporção entre os tipos celulares, é utilizado como indicandor da ocorrência de mastite, o processo inflamatório da glândula mamária.

A contagem de células somáticas (CCS), além de revelar o estado de saúde da glândula mamária do animal, vem sendo usada há muito tempo por diferentes países como indicador da qualidade higiênica do leite. Por exemplo, na Europa, a diretiva 92/46 da Comunidade Econômica Européia indicou, em abril 1992, que o leite com CCS acima de 400.000 células/ml não pode ser bebido e, a partir de 1998, não pode ser utilizado para fabricação de produtos lácteos em geral (Suriyasathaporn *et al.*, 2006). No Brasil, foi com a publicação da Instrução Normativa N° 51 (Brasil, 2002) que se estabeleceram as novas exigências para a produção de leite e que se incluiu pela primeira vez a CCS como um parâmetro de qualidade a ser controlado.

¹ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), R. Monteiro Lobato n.80, CEP 13083-862, CP 6121, Campinas-SP, Brasil. (mirna@fea.unicamp.br)

Diretoria Executiva do CBQL

Presidente: Prof. Dr. Paulo Fernando Machado (ES.ALQ - USP, Piracicaba-SP)

Vice-Presidente: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos (FMVZ - USP, Pirassununga, SP)

Diretor Administrativo: Laerte Dagber Cassoli (Engenheiro Agrônomo)

Diretor Tesoureiro: Felipe Cardoso (Médico Veterinário)

Diretor Secretário: Bruno Garcia Botaro (Médico Veterinário)

Secretária: Viviane Maia de Araújo (Zootecnista)

Comissão Organizadora do Congresso

Presidente: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa (DZ-UFRPE)

Secretária: Profa. Dra. Elisa Cristina Modesto (DZ-UFRPE)

Tesoureiro: Omer Cavalcante de Almeida (Zootecnista, LABNUTRIÇÃO/DZ/UFRPE)

Comissão Científica: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (DMV-UFRPE)

Comissão de Simpósios: Profa. Dra. Ângela Maria Vieira Batista (DZ-UFRPE)

Comissão de Apoio e Infra-estrutura: Profa. Dra. Lúcia Helena de Albuquerque Brasil (DZ-UFRPE)

Comissão de Comunicação e Informática: Prof. José Rodrigues Lemos

Comissão de Apoio Estudantil: Raquel Bezerra Jatobá (Zootecnista, PROGENE/DZ/UFRPE)

Assessoria Internacional: Prof. Dr. Humberto G. Monardes (McGill University, Canada)

Promoção

Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite

Realização

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Secretaria Executiva do CBQL

Secretária Executiva: Viviane Maia de Araújo

Clínica do leite/Esalq (USP)

Av. Pádua Dias, 11

CEP: 13418-900 - Piracicaba - SP

Email: cbql@cbql.com.br

Fones: (19) 3429.4278, (19) 3422.3980

Secretaria Executiva do III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite

PROMOVE - Promoções de Eventos Especiais

Au. Conselheiro Aguiar, 1555 - Sala 40

Boa Viagem - Recife - PE

CEP: 51111 - 010

Fone / Fax: (81) 3465-2627 / (81) 3301-3438

Email: promove@promoveeventos.com.br

Site: www.promoveeventos.com.br

Departamento de Zootecnia

Universidade Federal Rural de Pernambuco

R. Dom Manoel de Medeiros, S/N

52171-900 - Recife-PE

Fone/Fax: (81) 33206550

cbql@dz.ufrpe.br

Empresa de Turismo

Martur Viagens e Turismo - Filial Eventos

Au.: Boa Viagem, 4070 - Loja 04 - Boa Viagem

Térreo do Hotel Recife Palace Lucsim

Cidade: Recife/PE

CEP: 51021-000

Fone/Fax: (81) 3465-7778

E-mail: eventos@martur.com.br

Site: www.martur.com.br

Apoio

Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA

EMBRAPA

Fundação Apolônio Sales - EADURPE

Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária de Pernambuco - SARA/PE

Banco do Nordeste do Brasil

Prefeitura da Cidade do Recife - PCR

Empresa Pernambucana de Turismo - EMPETUR

CNPq

FACEPE

CAPEX

Associação dos Criadores de Pernambuco - ACP

Recife Convention & Visitors Bureau

Patrocinadores:

Bentley Instruments

Dairy Equipments Importação Ltda

Dairy Partners America - DPA (Nestlé - Fonterra)

Severino Benone Paes Barbosa
Ângela Maria Vieira Batista
Humberto Monardes
Organizadores

III CONGRESSO
BRASILEIRO DE
QUALIDADE
DO LEITE

Recife/Pernambuco
Brasil/2008