

## [066] QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE DE DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

KOLLING, Giovani Jacob<sup>1</sup>; ZANELA, Maira Balbinotti<sup>2</sup>; STUMPF, Marcelo Tempel<sup>1</sup>; BARTH, Anelise<sup>1</sup>; FISCHER, Vivian<sup>1</sup>; RIBEIRO, Maria Edi Rocha<sup>2</sup>; PEREIRA, Katarina Pagliani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [giovanikolling@hotmail.com](mailto:giovanikolling@hotmail.com); [marcelostumpf2003@yahoo.com.br](mailto:marcelostumpf2003@yahoo.com.br); [anebarth\\_88@hotmail.com](mailto:anebarth_88@hotmail.com); [vfried@portoweb.com.br](mailto:vfried@portoweb.com.br)

<sup>2</sup> Embrapa Clima Temperado, [maira.zanela@cpact.embrapa.br](mailto:maira.zanela@cpact.embrapa.br); [maria.edi@cpact.embrapa.br](mailto:maria.edi@cpact.embrapa.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, [katarinazoo@hotmail.com](mailto:katarinazoo@hotmail.com)

### INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em nutrientes, contendo proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais. Sua qualidade é um dos temas mais discutidos atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira. Isto se deve à grande importância do leite na alimentação e à necessidade do fornecimento de alimentos seguros ao consumidor. Devido à relevância que a qualidade do leite tem para os laticínios, qualquer alteração na mesma merece ressalva.

A saúde da glândula mamária é um dos fatores que mais afeta a contaminação microbiana do leite cru. A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária e pode ser classificada da forma clínica (apresentando sintomas) ou subclínica (sem sinais visíveis no leite ou no úbere) e determina mudanças nas concentrações dos principais componentes do leite. Na maioria dos casos, essa inflamação é resultado de infecção microbiana, através da penetração e da multiplicação de microrganismos nos quartos mamários. Ocorre quando fatores de manejo e de ambiente atuam em conjunto e permitem maior exposição da abertura do orifício da teta aos microrganismos que causam a doença [1].

A identificação do agente causador da mastite é de extrema importância, não apenas para o controle da doença, mas também para a tomada de decisões no rebanho, no que se refere a recomendações de tratamento e descarte para evitar a perda e diminuição da qualidade do leite.

Objetivou-se identificar os principais agentes microbianos encontrados em diferentes quartos mamários causadores de mastite subclínica em vacas leiteiras.

### MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de maio a setembro de 2011. Foram utilizadas nove vacas das raças Holandês e doze vacas da raça Jersey. Para seleção dos animais utilizou-se como critério de inclusão o teste do *California Mastitis Test* (CMT), sendo selecionadas as vacas que apresentassem pelo menos um quarto mamário normal (negativo ao teste) e os demais quartos com mastite subclínica. Como critério de exclusão, animais com mastite clínica ou com mais de 300 dias em lactação não foram utilizados no estudo.

Antes da ordenha, e após higienização dos tetos, os primeiros jatos de cada quarto foram utilizados para a realização do teste da caneca de fundo preto para identificação de mastite clínica e o CMT para identificação de mastite subclínica, sendo utilizando o detergente

comercial, de acordo com a metodologia de Langenegger et al. (1970)[2]. Após a seleção dos animais foi coletada uma amostra de leite individual de aproximadamente 20mL por quarto mamário em tubos estéreis devidamente identificados. As amostras foram armazenadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável e encaminhadas para análise microbiológica no Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da UFPEL, sendo semeadas em placas de Petry com meio de cultura Ágar sangue contendo 5% de sangue ovino desfibrinado. Logo após foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura constante de 37°C, durante 24-48 horas.

As colônias resultantes dos crescimentos bacterianos foram identificadas de acordo com a literatura [3]. As colônias foram estudadas de acordo com sua morfologia macroscópica, levando em consideração o número de colônias, tamanho, coloração e a viscosidade e também a presença de hemólise na placa. No momento da fixação em lâminas foi realizado o teste da catalase, importante para a distinção de bactérias que possam se assemelhar morfológicamente à microscopia óptica, como os gêneros *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Essas lâminas foram utilizadas para a realização da coloração de Gram, que tem por objetivo a análise microscópica, que permitiu o estudo da morfologia e arranjos bacterianos e a divisão em grupos Gram positivos e negativos. De acordo com os resultados encontrados em microscopia óptica foi possível a realização de provas bioquímicas para identificação da espécie bacteriana.

As bactérias foram caracterizadas, sendo os cocos Gram positivos, positivos ao teste da catalase e colônias esbranquiçadas com crescimento em 24 horas, considerados como gênero *Staphylococcus* e foi realizado, nessas cepas, o teste da coagulase para a diferenciação em dois grandes grupos de estafilococos. Aquelas cepas que apresentaram coagulação de plasma de cavalo, após 24 horas incubadas em estufa a 37°C, foram consideradas positivas ao teste. Os testes bioquímicos realizados com os estafilococos foram redução do manitol e maltose e VP (Prova de Voges-Proskauer), além da formação e do tipo de hemólise em placa [4].

Cocos Gram positivos, arrançados em forma de corrente ou “colar de pérolas”, negativos ao teste da catalase, com colônias pequenas e translúcidas com crescimento em aproximadamente 24 horas foram considerados como gênero *Streptococcus*. Provas bioquímicas foram realizadas para diferenciação de espécie. As provas de CAMP, esculina, manitol e salicina foram realizadas e as placas e tubos incubados, por 24 horas em estufa a 37°C, para posterior leitura. A observação do padrão de hemólise também foi considerada.

Bactérias Gram positivas, com morfologia filamentosa e arranjada, na maioria das vezes em paliçada, catalase positivos, com colônias pequenas, esbranquiçadas, opacas e convexas que crescem em maior quantidade na parte gordurosa do leite semeado em aproximadamente 48 horas de incubação, foram classificados como microrganismos do gênero *Corynebacterium*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 84 quartos mamários de vacas em lactação. Destes, 27,38% apresentaram reação negativa ao CMT, 30,96% CMT1; 25% CMT2 e 16,66% CMT3.

A partir da análise dos microrganismos isolados no leite dos quartos mamários das vacas com mastite subclínica pode-se observar que houve prevalência de *Corynebacterium* sp. entre os microrganismos isolados (27,38%), seguidos por bactérias do gênero estafilococos coagulase negativa (13,10%). Destaca-se que, mesmo havendo reação positiva no teste do CMT, 48,81% das amostras de leite não apresentaram crescimento bacteriano (Tab. 1).

**Tabela 1:** Microrganismos isolados no leite de quartos mamários das vacas selecionadas no experimento de acordo com a reação de CMT.

Microrganismo	Reação CMT				Total	%
	0	1	2	3		
Sem crescimento	11	12	13	5	41	48,81
<i>Corynebacterium</i> sp.	8	8	5	2	23	27,38
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	3	3	2	3	11	13,10
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1	2		2	5	5,95
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva + <i>Corynebacterium</i> sp.				1	1	1,19
<i>Streptococcus</i> sp. + <i>Corynebacterium</i> sp.			1		1	1,19
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Streptococcus</i> sp.				1	1	1,19
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Corynebacterium</i> sp.		1			1	1,19
<b>Total Geral</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>21</b>	<b>14</b>	<b>84</b>	<b>100</b>

Na mastite subclínica, a reação inflamatória pode estar presente mesmo sem processo infeccioso na glândula, devido às lesões traumáticas, agressões por agentes químicos ou o agente microbiano pode ainda já ter sido eliminado de forma natural pelos processos de auto cura, resultando em cultura negativa [5]. Este fato possivelmente tenha contribuído para a falta de isolamento microbiológico das amostras analisadas, apesar de 73,17% destas apresentarem reação positiva de diferentes graus no CMT.

Os resultados negativos ao CMT são plenamente confiáveis e muito úteis nos trabalhos de campo [6], entretanto, outros autores discordam quanto à negatividade ao CMT em relação à presença de agentes microbianos, caracterizando os animais portadores. Segundo estes autores, o animal portador não apresenta reação positiva ao teste de CMT, mas pode apresentar resultado positivo ao exame microbiológico [7]. No presente trabalho, das 23 amostras negativas ao CMT, 52,17% apresentaram crescimento microbiológico.

O *Corynebacterium* sp. dissemina-se entre os animais durante o processo de ordenha, caso esta operação não seja conduzida de forma higiênica. Além disso, uma elevada prevalência de infecções intramamárias é um indicativo da ausência ou ineficiência da desinfecção dos tetos após a ordenha, processo esse denominado *pós-dipping*.

Além disso, o *Corynebacterium* sp. é um patógeno de significado relevante nas mastites, seja pelo aumento da taxa de seu isolamento, observado nos últimos anos, bem como pela demonstração da elevação do conteúdo celular do leite, acarretando grandes perdas econômicas aos produtores e às indústrias de subprodutos lácteos [8].

O *Corynebacterium* sp. causa primariamente infecções subclínicas e é considerado como um patógeno de significância limitada ou um microrganismo comensal da glândula. Entretanto, a sua elevada prevalência em infecções intramamárias [9] e a sua influência negativa na produção leiteira [10] sugerem que talvez seja mais apropriado não considerá-lo um patógeno secundário. De acordo com Carneiro et al. (2009) [11], a mastite causada por patógenos chamados menores ou secundários e microrganismos ambientais são o principal desafio para a indústria leiteira moderna.

## CONCLUSÕES

O principal agente isolado no leite dos animais com mastite subclínica é o *Corynebacterium* sp.

A mastite subclínica não pressupõe o isolamento de um agente etiológico, e pode haver presença de animais portadores no rebanho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fonseca LFL, Santos, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- [2] Lagenegger J, Coelho NM, Langenegger CH, Castro RP. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 1970; 437:440-5.
- [3] Hogan JS, Gonzales RN, Harmon RJ, Nikerson SP, Pankey JW, Smith KL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Medison, 1999. 222p
- [4] Krieg NR, Holt JC. Bergey's manual of systematic bacteriology.9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 1268p.
- [5] Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf JW, Gomes JF, Schiramm RC, Martins PR, Barbosa RS. Relação entre mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Agrociência, 2003. n.3, 287:290-9
- [6] Figueiredo JB. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11., 1995, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 1995. p.176.
- [7] Costa EO, Ribeiro AR, Garino Jr. F. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 28, 2001, Salvador, Anais... p.159.
- [8] Victória C, Silva AV, Elias AO, Langoni H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, v.8, p.161-164, 2005.
- [9] Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. Journal of Dairy Science, v.87, p.2433-2441, 2004.
- [10] Zafalon LF, Nader Filho A, Amaral LA, Oliveira JV, Resende FD, Oliveira JA. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos

sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. Revista Napgama, n.6, p.4-6, 1999.

[11] Carneiro DMVF, Domingues PF, Vaz AK. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. Ciência Rural, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.