

CULTIVO MICROBIOLÓGICO E A SENSIBILIDADE NO ISOLAMENTO DE PATÓGENOS NAS MASTITES BOVINAS*

Helio Langoni¹
Felipe Laurino²
Patrícia Yoshida Faccioli³
Aristeu Vieira da Silva⁴
Benedito Donizete Menozzi⁵

RESUMO

O leite é importante na dieta do homem e sua qualidade é fundamental. O principal problema nos rebanhos leiteiros que afeta essa qualidade e causa prejuízos econômicos é a mastite. O diagnóstico microbiológico das mastites é o método ouro para identificar a sua etiologia e importante na orientação das medidas profiláticas. Considerando-se que vários trabalhos relatam grande porcentagem de lactoculturas negativas, o objetivo do presente estudo foi avaliar microbiologicamente, por diferentes técnicas, amostras de leite provenientes de casos de mastites subclínicas, procurando-se melhorar a sensibilidade do exame microbiológico pela redução de resultados falso-negativos. Foram estudadas 220 amostras de leite CMT positivo. Após centrifugação, pré-incubação e congelamento os percentuais de culturas positivas foram 64,6%, 82,3% e 61,2%. Houve melhora da sensibilidade do exame microbiológico pelo uso das técnicas de centrifugação, pré-incubação e congelamento quando utilizadas isoladamente ou associadas. Conclui-se que essas técnicas são recomendadas para melhorar a sensibilidade do exame microbiológico no diagnóstico das mastites subclínicas. Além disso, a detecção acurada de casos de mastites por agentes como *Staphylococcus aureus* impede a manutenção no rebanho de animais infectados por um patógeno altamente contagioso, que é objetivo de controle em muitos países.

Palavras-chave: mastite, cultivo microbiano, métodos

MICROBIOLOGICAL CULTURE AND THE SENSIBILITY IN PATHOGENS ISOLATION ON BOVINE MASTITIS

ABSTRACT

Milk is important to man diet and its quality is fundamental. The main problem in dairy herds that affects this quality and causes economic damage is the mastitis. The microbiological diagnosis of mastitis is the standard method to identify its etiology and it is important to guide the prophylactic measures. Considering that many studies report large percentage of negative lacto cultures, the aim of the present study was to evaluate microbiologically milk samples

¹ Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000, (14) 3811-6270, hlangoni@fmvz.unesp.br.

² Graduando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – bolsista PIBIC/CNPq.

³ Doutoranda do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu.

⁴ Docente da Universidade Paranaense – UNIPAR.

⁵ Técnico do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu.

* Bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

from subclinical mastitis cases using different techniques to improve the sensibility of microbiological exam and by reducing false negative results. Two hundred and twenty milk samples with CMT positive were studied. After centrifugation, pre incubation and freeze the percentages of positive cultures were 64,6%, 82,3% e 61,2%. There was sensibility improvement of microbiological exam by using centrifugation, pre incubation and freeze techniques when they was carried out separately or associated. We conclude that these techniques are recommended to improve the microbiological exam sensibility on subclinical mastitis diagnosis. Furthermore, the accurate detection of mastitis cases by agents as *Staphylococcus aureus* prevents the maintenance in herd of infected animals with a highly contagious pathogen what is the aim of control of many countries.

Key words: mastitis, microbiological culture, method

CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y LA SENSIBILIDAD DE AISLAMIENTO DE PATÓGENOS EN LAS MASTITIS BOVINAS

RESUMEN

La leche es importante en la dieta de los seres humanos y su calidad es esencial. El principal problema en ganados lecheros que afecta a la calidad y el daño económico es la mastitis. El diagnóstico microbiológico de mastitis es el método de oro para identificar su etiología e importante en la orientación de las medidas profilácticas. Teniendo en cuenta que varios estudios informaron alto porcentaje de lactoculturas negativas, el propósito de este estudio fue evaluar microbiológicamente, mediante diferentes técnicas, las muestras de leche de los casos de mastitis subclínica, con el objetivo de mejorar la sensibilidad del análisis microbiológico por la reducción de falsas negativo. Se estudiaron 220 muestras de leche CMT positivas. Después de la centrifugación, de la pre-incubación y la congelación, el porcentaje de cultivos positivos fueron 64,6%, 82,3% y 61,2%. Hubo mejoría de la sensibilidad de los exámenes microbiológicos utilizando las técnicas de centrifugación, de pre-incubación y la congelación cuando se utilizan solas o combinadas. Se concluye que estas técnicas se recomiendan para mejorar la sensibilidad del análisis microbiológico en el diagnóstico de la mastitis subclínica. Además, la precisión de detección de casos de mastitis por agentes tales como *Staphylococcus aureus* impide el mantenimiento de los animales infectados en el rebaño por un agente patógeno altamente contagioso, que tiene por objeto el control en muchos países.

Palabras-clave: mastitis, cultivo microbiano, métodos

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento fundamental na dieta do homem, em todas as faixas etárias, extremamente importante para a saúde humana. A qualidade do leite que chega para ser beneficiado nos laticínios depende em grande parte do processo de obtenção nas propriedades (1). O principal problema na sua qualidade é a infecção das glândulas mamárias, a mastite, que continua sendo a doença mais frequente nos bovinos leiteiros, ocasionando grandes perdas econômicas para a indústria leiteira (2).

A alta prevalência da mastite no gado leiteiro tem sua importância devido às perdas econômicas por reduzir a produção e pelo menor rendimento dos produtos lácteos (3), e além de ocasionar alterações dos seus principais componentes, deve se considerar os aspectos de saúde pública, pela veiculação de microrganismos no leite. Os microrganismos envolvidos no

processo infeccioso são classificados em dois grupos: os contagiosos, que se disseminam entre os animais durante a ordenha; e os ambientais, geralmente presentes no meio ambiente, e que a partir dessa fonte alcançam a glândula mamária via canal galactoforo. De maneira geral estão envolvidos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, enterobactérias, e outros (4, 5, 6).

O seu diagnóstico é realizado pelo isolamento e identificação dos microrganismos causais pelo cultivo microbiológico, considerado como método ouro para caracterizar a etiologia das mastites, sendo fundamental para um programa de controle de mastite, entretanto mais de 50% das culturas de leite com mastite clínica ou subclínica podem ser negativas (7), o que pode ser devido a casos com desaparecimento espontâneo do agente (8), eliminação intermitente nas infecções crônicas ou a sua presença reduzida no leite (9). São ainda fatores de ocorrência de resultados negativos a destruição das bactérias no curso da reação inflamatória e ainda por protocolos inadequados no isolamento, ou nos casos de outros agentes infecciosos como *Mycoplasma spp*, *Leptospira spp*, *Campylobacter spp*, fungos, vírus e nos casos de processos inflamatórios de origem alérgica, metabólica, tóxica e traumática (10), é um sério problema para a criação pela manutenção de fontes de infecção no rebanho.

Em vários estudos de mastites subclínicas a porcentagem de culturas negativas oscila de 28,7% (11) a 38,6% (12). O resultado negativo de uma lactocultura não é frustrante somente para o fazendeiro e veterinário que submeteram as amostras de leite para exame, mas também para o laboratório responsável pelo diagnóstico de mastites (13).

Considerando-se a importância do diagnóstico microbiológico nos processos infecciosos, e especificamente nas mastites por orientar medidas profiláticas, ao se verificar se os agentes envolvidos são de caráter contagioso ou ambiental, o objetivo do presente estudo foi avaliar microbiologicamente, por diferentes técnicas, amostras de leite provenientes de casos de mastites subclínicas, procurando-se melhorar a sensibilidade do exame microbiológico, pela redução da ocorrência de resultados falso negativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas fêmeas bovinas de raça holandesa, submetidas ao exame do CMT segundo Schalm & Noorlander (14), considerando-se como positivas as amostras de leite com reações a partir de uma cruz (1+), na detecção de mastite subclínica. Foram examinadas no total 1090 amostras de leite. Após a limpeza do teto, lavagem com água corrente, secagem com toalha de papel descartável e desinfecção do óstio da teta com solução de álcool iodado a 5%, desprezaram-se os primeiros jatos de leite, colhendo-se amostras ao redor de 25 ml de leite para realização do exame microbiológico, perfazendo 220 amostras positivas, que foram transportadas para o laboratório sob temperatura de refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. No laboratório, cada amostra foi dividida pipetando-se 5 ml em 4 tubos estéreis identificados para os diferentes procedimentos microbiológicos, como segue:

Exame microbiológico direto

Com um dos tubos foi realizada a pesquisa da flora bacteriana aeróbica, semeando-se 0,01 ml de leite em duplicata em meio de ágar base adicionado de 5% de sangue ovino e em ágar MacConkey, incubando-se a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, durante três dias. Estudou-se a morfologia das colônias com anotações de características como tamanho, forma, coloração, produção de pigmento e hemólise. Os microrganismos isolados foram contados, considerando-se como crescimento discreto até

nove colônias, moderado de 10 até 29 e exuberante 30 ou mais colônias do mesmo agente. Realizou-se exame bacterioscópico das colônias isoladas pelo método de Gram, verificando-se as características tintoriais e morfológicas. Os microrganismos isolados foram repicados para meio de caldo cérebro coração para caracterização bioquímica de acordo com Holt (15).

Na interpretação dos agentes isolados, nas diferentes situações ou procedimentos microbiológicos adotados, as amostras de leite foram consideradas contaminadas quando foram isolados três ou mais tipos de microrganismos. Foram consideradas negativas quando menos de três colônias de somente um microrganismo foram isoladas, exceto para *Staphylococcus aureus* cuja amostra foi considerada positiva quando houve o isolamento de uma ou mais colônias (16).

Centrifugação

Amostra de 5 ml de leite foi centrifugada à 2000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma alíquota de 0,01ml do sedimento foi cultivada de acordo com os procedimentos adotados anteriormente.

Congelamento e descongelamento

Um dos tubos com 5 ml da amostra de leite foi mantido sob temperatura de congelamento -20°C durante sete dias e submetido ao descongelamento à temperatura ambiente, procedendo-se como nas situações anteriores, quanto ao volume de inóculo, ao tempo de observação, temperatura de incubação e caracterização dos agentes isolados.

Pré-incubação

Amostra de 5 ml de leite, foi submetida à pré-incubação à 37°C durante 18 horas, e a seguir cultivou-se 0,01 ml nos mesmos meios de cultura, procedendo-se como anteriormente.

Os resultados das contagens bacterianas obtidas nas diferentes técnicas de isolamento foram comparados e analisados estatisticamente utilizando-se o teste de McNemar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à análise dos resultados dos exames microbiológicos, nos cultivos diretos, após centrifugação, pré-incubação ou congelamento, os resultados são apresentados na tabela 1 de acordo com o isolamento discreto, moderado e exuberante.

Tabela 1. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto	Centrifugação	Pré-incubação	Congelamento
Negativo	50 (38,5)	46 (35,4)	20 (17,7)	50 (38,5)
Discreto	14 (10,8)	17 (13,1)	6 (5,3)	21 (16,3)
Moderado	11 (8,5)	7 (5,4)	2 (1,8)	7 (5,4)
Exuberante	55 (42,3)	60 (46,2)	85 (75,2)	51 (39,5)
Total	130	130	113	129

Estatística: $\chi^2=41,49$ ($p<0,0001$).

Após centrifugação, pré-incubação e congelamento o percentual de culturas positivas foi 64,6%, 82,3% e 61,2%, respectivamente (Tabela 2), sendo que a pré-incubação proporcionou o maior percentual de culturas positivas, pois na cultura direta 38,5% foram negativas enquanto que após pré-incubação somente 17,7%. Verifica-se, portanto diminuição do número de resultados falso-negativos com a associação dos métodos de centrifugação, pré-incubação e congelamento, concordando com Sol et al. (17) e Makovec & Ruegg (7).

Tabela 2. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento. Botucatu, 2009.

Resultado	Direto	Centrifugação	Pré-incubação	Congelamento
Negativo	50 (38,5)	46 (35,4)	20 (17,7)	50 (38,5)
Positivo	80 (61,5)	84 (64,6)	93 (82,3)	79 (61,2)

Estatística: $\chi^2=15,97$ (p=0,0011).

A pré-incubação possibilita o isolamento de microrganismos principalmente ambientais, reforçando-se a importância dos processos higiênicos para a obtenção das amostras de leite. Apesar do isolamento de patógenos envolvidos nas mastites, no presente estudo isolou-se *Bacillus* spp e coliformes, considerados como contaminantes, que se desenvolveram no leite durante a pré-incubação, considerando-se que estes não foram isolados na cultura direta, bem como após o congelamento.

A análise referente às amostras negativas no exame direto com isolamento subsequente de um único microrganismo pode ser observado na tabela 3. De acordo com o microrganismo isolado subsequentemente, no caso de *Staphylococcus aureus* os resultados podem ser apreciados na tabela 4 e para *Staphylococcus epidermidis*, tabela 5. No caso de *Streptococcus dysgalactiae* e *S. agalactiae*, tabelas 6 e 7, respectivamente. No caso de *Corynebacterium bovis*, tabela 8.

Tabela 3. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento. Botucatu, 2009.

Isolamento	Centrifugação	Pré-incubação	Congelamento
Negativo	39 (78,0)	18 (42,9)	39 (79,6)
Discreto	5 (10,0)	2 (4,8)	7 (14,3)
Moderado	3 (6,0)	2 (4,8)	1 (2,0)
Exuberante	3 (6,0)	20 (47,6)	2 (4,1)
Total	50	42	49

Estatística: $\chi^2=38,80$ (p<0,0001).

Tabela 4. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento, em amostras em que houve isolamento de *Staphylococcus aureus*. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto		Centrifugação		Pré-incubação		Congelamento	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo	22	59,5	22	59,5	18	54,5	23	62,2
Discreto	0	0,0	0	0,0	1	3,0	0	0,0
Moderado	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	5,4
Exuberante	15	40,5	15	40,5	14	42,4	12	32,4
Total	37		37		33		37	

Estatística: $\chi^2=9,87$ (p=0,3604)

Tabela 5. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento, em amostras em que houve isolamento de *Staphylococcus epidermidis*. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto		Centrifugação		Pré-incubação		Congelamento	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo	31	70,5	25	56,8	16	39,0	28	65,1
Discreto	3	6,8	4	9,1	3	7,3	4	9,3
Moderado	2	4,5	6	13,6	2	4,9	2	4,7
Exuberante	8	18,2	9	20,5	20	48,8	9	20,9
Total	44		44		41		43	

Estatística: $\chi^2=43,64$ (p<0,0001)

Tabela 6. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento, em amostras em que houve o isolamento de *Streptococcus dysgalactiae*. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto		Centrifugação		Pré-incubação		Congelamento	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo	26	63,4	26	63,4	18	51,4	26	63,4
Discreto	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,4
Moderado	1	2,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Exuberante	14	34,1	15	36,6	17	48,6	14	34,1
Total	41		41		35		41	

Estatística: $\chi^2=7,72$ (p=0,5622)

Tabela 7. Frequência absoluta (f) e relativa (fi) dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento, em amostras em que houve isolamento de *Streptococcus agalactiae*. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto		Centrifugação		Pré-incubação		Congelamento	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo	23	63,9	22	61,1	18	56,3	23	63,9
Discreto	1	2,8	1	2,8	0	0,0	1	2,8
Moderado	3	8,3	1	2,8	0	0,0	1	2,8
Exuberante	9	25,0	12	33,3	14	43,8	11	30,6
Total	36		36		32		36	

Estatística: $\chi^2=38,03$ (p<0,0001)

Tabela 8. Frequência absoluta (f) e relativa dos resultados de cultivos ao exame direto e após centrifugação, pré-incubação e congelamento, segundo o grau de crescimento, em amostras em que houve isolamento de *Corynebacterium bovis*. Botucatu, 2009.

Isolamento	Direto		Centrifugação		Pré-incubação		Congelamento	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo	26	59,1	28	63,6	19	61,3	27	61,4
Discreto	7	15,9	9	20,5	0	0,0	12	27,3
Moderado	5	11,4	0	0,0	0	0,0	1	2,3
Exuberante	6	13,6	7	15,9	12	38,7	4	9,1
Total	44		44		31		44	

Estatística: $\chi^2=28,39$ (p=0,0008)

A ocorrência de resultados falso-negativos em amostras de leite submetidas à cultura pode resultar na manutenção de animais infectados no rebanho, contribuindo para o insucesso nos programas de controle das mastites, principalmente nas contagiosas. Os microrganismos isolados após o tratamento das amostras de leite por congelamento, pré-incubação ou centrifugação mostram a recuperação de *Staphylococcus aureus* após centrifugação, pré-incubação e congelamento de três amostras de leite além de outros patógenos como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Klebsiella pneumoniae*, variáveis de acordo com a técnica de cultivo utilizada.

CONCLUSÕES

Conclui-se nas condições do presente estudo que as técnicas de centrifugação, pré-incubação e congelamento são recomendadas para melhorar a sensibilidade do exame microbiológico no diagnóstico de mastites subclínicas. Os resultados são variáveis de acordo com a técnica utilizada, entretanto a associação das técnicas empregadas permitiu concluir o diagnóstico microbiológico em um número maior de casos. A detecção de casos de mastites por agentes como *Staphylococcus aureus* impede a manutenção no rebanho de animais positivos para este patógeno, altamente contagioso e que é objetivo de controle em rebanhos de muitos países, que descartam vacas com recidiva de mastite por este agente.

AGRADECIMENTOS: a Daniel da Silva Penachio e Juliana Cristina Cardoso Citadella pela participação nas colheitas de amostras de leite e realização do exame do *California Mastitis Test*.

REFERÊNCIAS

1. Philpot WN. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: Simpósio Internacional Sobre Qualidade Do Leite, 1., 1998, Curitiba. Anais... Curitiba, 1998, p.28-35.
2. Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet. Quart., v.29, n.1, p.18-31, 2007.
3. Philpot WN, Nickerson SC. (Ed.) Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis. Illinois: Babson Brothers Co., 1991. 150p.

4. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. Rev. Bras. Med. Vet., v.20, n.5, p.204-209, 1998.
5. Costa EO, Benites NR, Melville PA, Pardo RB, Ribeiro AR, Watanabe ET. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. Rev. Bras. Med. Vet., v.17, n.4, p.156-8, 1995.
6. Zafalon LF, Langoni H, Benvenuto F, Castelani L, Broccolo CR. Aspectos Epidemiológicos da Mastite Bovina causada por *Staphylococcus aureus*. Vet. Zoot., v.15, p.56-65, 2008.
7. Makovec JA, Ruegg PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J. Dairy Sci. v.86, p.3466-3472, 2003.
8. Smith KL, Todhunter PA, Schomberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J. Dairy Sci., v.68, p.1531-53, 1985.
9. Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. J. Dairy Sci. v.73, p.2785-2790, 1990.
10. Duarte MPMB, Gomes MJP, Bercht BS, Snel GGM, Silva RP. Mastite bovina: qual o motivo do não crescimento de microrganismos após a lactocultura? Anais do IV Encontro de Pesquisadores em Mastites. Botucatu, 2007.
11. Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä, S. et al. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta Agric. Scand. A., v.57, p.89-96, 2007.
12. Bradley AJ, Leach KA, Breen JE. et al. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec., v.160, p.253-258, 2007.
13. Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, et al. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. J. Dairy Sci., v.92, p.2610-2617, 2009.
14. Schalm GN, Noorlander DD. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Med. Assoc., v.130, p.199-204, 1957.
15. Holt JG. (Ed). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994. v.1. 816p.
16. NMC. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, WI.
17. Sol J, Sampimon OC, Hartman E, Barkema HW. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. Vet. Microbiol., v.85, p.241-249, 2002.

Recebido em: 05/08/2009

Aceito em: 23/10/2009