

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E CITOLÓGICOS DO LEITE NA MASTITE CAPRINA SUBCLÍNICA

Helio Langoni^{1*}
Juliana Cristina Cardoso Citadella²
Gustavo Puglia Machado³
Patrícia Yoshida Faccioli³
Simone Baldini Lucheis⁴
Aristeu Vieira da Silva⁵

RESUMO

O leite caprino é um produto importante na alimentação humana, pois além de elevado teor nutritivo é indicado para crianças, idosos e pessoas debilitadas, e aceito por indivíduos que têm intolerância ao leite bovino. Foram examinadas 720 amostras de leite de 378 cabras leiteiras das raças Saanen e Anglo-Nubiana procedentes de dez propriedades rurais localizadas no estado de São Paulo e Minas Gerais, pelo California Mastitis Test (CMT), cultivando as amostras a partir da reação +. Foram isolados *Staphylococcus aureus* (34,6%), *Staphylococcus epidermidis* (26%), *Staphylococcus caprae* (25%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,7%), *Corynebacterium bovis* (2,9%), *Streptococcus uberis* (1,9%), *Escherichia coli* (1,9%) e *Micrococcus* spp (1%). A média de Contagem de Células Somáticas (CCS) variou entre 119,8 a 899,5 CCS/mL de leite nas propriedades estudadas. Apesar de não ter-se encontrado correlação significativa entre CMT e CCS/mL de leite, deve-se considerar o aumento significativo da CCS nas amostras de leite com reação +++ ao CMT. Pode-se considerar que a ocorrência de mastite subclínica na espécie caprina é elevada e que a microbiota é ampla e o *S. aureus* foi o de maior ocorrência.

Palavras-chave: caprino, leite, microbiologia, citologia

CYTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF MILK ON GOAT'S SUBCLINICAL MASTITIS

ABSTRACT

Goat's milk is an important product in human alimentation, since it presents an elevated nutritional content indicated for children, the elderly and the disabled. It is accepted by persons who are intolerant to bovine milk. 720 samples of goat's milk were collected from 378 dairy goat's of Saanen and Anglo-Nubian race coming from ten rural properties within the Brazilian state of São Paulo (n=8) and Minas Gerais (n=2), by California Mastitis Test (CMT), cultivating samples from the reaction +. Were isolated *Staphylococcus aureus* (34.6%), *Staphylococcus epidermidis* (26%), *Staphylococcus caprae* (25%), *Streptococcus dysgalactiae* (6.7%), *Corynebacterium bovis* (2.9%), *Streptococcus uberis* (1.9%),

¹ Professor Titular - FMVZ - UNESP - Botucatu-SP. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1A.

* Autor para correspondência: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Distrito de Rubião Junior s/n, CEP 18.618-970, Botucatu-SP. hlangoni@fmvz.unesp.br

² Bolsista de Iniciação Científica - FAPESP - Processo: 2006/07123

³ Doutorandos da FMVZ - UNESP - Botucatu-SP.

⁴ Pesquisadora da Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios - APTA/SAA - Pólo Centro-Oeste - Unidade de Pesquisa de Bauru.

⁵ Prof. Adjunto, UEFS, Feira de Santana, Bahia.

Escherichia coli (1,9%), and *Micrococcus spp* (1%). The average of Somatic Cells Counts (SCC) range from 119.8 to 899.5 SCC/mL of milk. Despite not having found a significant correlation between CMT and SCC/mL of milk, the significant SCC increase of milk samples with reaction +++ to CMT must be considered. Consider that there is occurrence of subclinical mastitis in goats is high, the microbiota is wide and *S. aureus* was the most frequent.

Key-words: goat, milk, microbiology, cytology

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y CITOLÓGICOS DE LA LECHE EN MASTITIS CAPRINA SUBCLÍNICA

RESUMEN

La leche de cabra es un producto importante para la alimentación humana, y debido a su alto contenido nutricional es adecuado para niños, ancianos, personas físicamente debilitadas e individuos intolerantes a la leche de bovino. Por medio del California Mastitis Test (CMT), fueron analizadas 720 muestras de leche de 378 cabras lactantes de las razas Saanen y Anglo-Nubiana provenientes de diez propiedades rurales del estado de São Paulo (n=8) y Minas Gerais (n=2). El cultivo de las muestras fue realizado a partir de la reacción + a CMT. Fueron aislados *Staphylococcus aureus* (34,6%), *Staphylococcus epidermidis* (26%), *Staphylococcus caprae* (25%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,7%), *Corynebacterium bovis* (2,9%), *Streptococcus uberis* (1,9%), *Escherichia coli* (1,9%) y *Micrococcus spp* (1%). El promedio del conteo de células somáticas (CCS) varió de 119,8 a 899,5 CCS/mL de leche en las propiedades estudiadas. A pesar de no haber sido encontrada una correlación significativa entre la CMT y el CCS/mL, se debe considerar el aumento significativo de CCS en las muestras de leche con reacción +++ al CMT. La ocurrencia de mastitis subclínica en la especie caprina es alta, la microbiota es amplia y *S. aureus* fue el microorganismo más frecuente.

Palabras-clave: cabra, leche, microbiología, citología

INTRODUÇÃO

A qualidade do leite está diretamente associada a saúde, alimentação e manejo dos animais, bem como à qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. O leite caprino é importante para a alimentação humana e considerado um substituto nos casos de intolerância ao leite bovino. Apesar de sua importância como alimento, pode veicular uma série de microorganismos patogênicos para o homem.

Os agentes etiológicos identificados na mastite caprina, são semelhantes aos encontrados na mastite bovina, como estafilococos coagulase positivos (ECP), estafilococos coagulase negativos (ECN), *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* entre outros (1). Na forma subclínica, são isolados com maior frequência os ECN (2-4). As infecções relacionadas aos *S. aureus* são na maioria das vezes atribuídas à higiene inadequada durante a ordenha, pela sucção excessiva do cabrito ou pelo contato com pastagens contaminadas, podendo levar a quadros de mastites gangrenosas, devido às toxinas específicas responsáveis por lesões graves na mama, como a α -toxina que produz a necrose dos alvéolos (5).

Langoni et al. (6) encontraram *Staphylococcus epidermidis* (50%), *Streptococcus agalactiae* (13,6%), *Staphylococcus aureus* (11,4%), *Corynebacterium bovis* (8,6%) e

Candida albicans (5%), em amostras de leite de cabras com mastite subclínica, das raças Saanen, Parda Alpina e Toggenburg. Trabalhando com 1295 amostras de leite a partir de metades mamárias, Mendonça et al. (7) obtiveram 41,2% de animais não infectados, 17,7% infectados com patógenos menores e 41,1% com patógenos maiores. Consideraram que do total de amostras examinadas, 58,89% tratavam-se provavelmente de casos subclínicos de mastites.

As células somáticas constituem diferentes elementos celulares presentes no leite, compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação. A CCS é utilizada como um indicador de mastites subclínicas, sendo que altas contagens podem estar associadas com diminuição na produção e prejuízo na qualidade do leite (8). Entre outros fatores que podem provocar aumento na CCS, estão as mastites, sobretudo as bacterianas (9). A pesquisa de células somáticas no leite é uma ferramenta importante de acompanhamento do estado sanitário do úbere e qualidade do leite, já que nas mastites a CCS está aumentada (8).

Os pequenos ruminantes, principalmente os caprinos, podem fisiologicamente apresentar maior quantidade de células no leite não relacionado, necessariamente ao processo inflamatório, embora haja correlação negativa entre a produção de leite e a celularidade do leite de caprinos. O CMT e a CCS são os métodos mais utilizados em caprinos e há uma relação direta entre eles (10). A precisão do CMT na espécie caprina é discutível, pela presença de células epiteliais que reagem com os leucócitos (11). Devem ser consideradas como positivas as reações com grau máximo de gelificação, pois o leite caprino apresenta CCS fisiologicamente elevada e, apesar de ainda não haver limite estabelecido, não é rara a ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 cel/mL (12), fato que se acentua no final da lactação, mesmo na ausência de infecções intramamárias (9).

Considerando-se a importância do conhecimento da microbiota nos casos de mastites para adoção de medidas de controle, o presente trabalho teve como objetivo estudar os patógenos presentes em amostras de leite caprino, de acordo com os resultados obtidos no CMT (1+ a 3+), e pela contagem eletrônica de células somáticas (mL/leite).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 378 cabras das raças Saanen e Anglo-Nubiana, de dez propriedades rurais, localizadas nos estados de São Paulo (n=8) e Minas Gerais (n=2). Antes da colheita das amostras de leite, as metades mamárias foram examinadas, avaliando-se a textura do parênquima, a presença ou não de nódulos, áreas de fibrose e abscessos. Após o exame físico, realizou-se a lavagem com água corrente e antissepsia das metades mamárias com solução pré-dipping de tintura de iodo a 0,5%, e secagem com papel toalha descartável. Foram examinados os primeiros jatos de leite em caneca de fundo escuro de 720 tetos, pois 36 apresentavam-se fibrosados ou perdidos.

Foi realizado o teste do CMT como triagem, segundo Schalm e Noorlander (13), em 720 tetos considerando-se positivas as reações 1+, objetivando avaliar a relação CMT/CCS, de acordo com o grau de reação ao CMT. Após serem desprezados os três primeiros jatos de leite e realizada a antissepsia, foram colhidos 5 mL de leite, em tubos estéreis, das amostras consideradas positivas para realização dos exames microbiológicos e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas, sob temperatura de refrigeração.

A pesquisa dos micro-organismos nas amostras positivas foi realizada semeando-se 0,1 mL de leite de cada amostra em meio de ágar sangue com 5% de sangue ovino e em ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C e o desenvolvimento microbiano foi observado às 24, 48 e 72 horas. Estudou-se a morfologia das colônias, anotando-se características de tamanho, forma, produção ou não de pigmento e hemólise, tendo-se considerado como cultura positiva quando houve o isolamento de pelo menos três colônias de

um mesmo micro-organismo, exceto para *S. aureus*, que foi considerada como positiva a partir de uma colônia. Quando houve o isolamento de três ou mais micro-organismos, considerou-se como contaminadas (14).

De cada micro-organismo isolado, repicou-se de 1 a 3 colônias para o meio de caldo cérebro-coração (BHI), para caracterização bioquímica de acordo com Quinn et al. (15). Independente do resultado do CMT, obteve-se amostra de 50 mL de leite de cada metade mamária para realização da CCS eletrônica em aparelho SOMACOUNT-300® (Bentley).

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e coeficiente de Spearmann no programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS) (16), comparando as frequências de isolamento dos diferentes micro-organismos nas dez propriedades e os resultados obtidos na CCS/mL de leite, bem como das médias e medianas de cada propriedade avaliada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao CMT, de acordo com o grau de reação nas dez propriedades estão apresentados na tabela 1. Foram encontrados 66,8% de amostras negativas e 13,9%, 6,8% e 12,5% com reações +, ++ e +++, respectivamente. Analisando-se o resultado especificamente para as reações 3+, verifica-se 12,5% de mastite subclínica, que está de acordo com Perrin et al. (17). Na interpretação dos resultados do CMT deve-se considerar como infecção intramamária as reações com gelificação intensa (11), característica das reações +++. No presente estudo considerou-se como positivas as reações a partir do escore 1+, procurando-se correlacionar os resultados do CMT com a CCS de cada amostra de leite, como mostra a tabela 3.

Tabela 1. Resultados em percentual (%) dos exames do CMT em leite caprino, de acordo com o grau de positividade nas propriedades dos estados de São Paulo e Minas Gerais, 2011.

| Propriedades | n° de tetos | California Mastitis Test | | | | | | | |
|--------------|-------------|--------------------------|------|-----|------|----|------|-----|------|
| | | - | | + | | ++ | | +++ | |
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 104 | 55 | 52,9 | 21 | 20,2 | 8 | 7,7 | 20 | 19,2 |
| 2 | 10 | 2 | 20 | 3 | 30 | - | - | 5 | 50 |
| 3 | 20 | 6 | 30 | 10 | 50 | 1 | 5 | 3 | 15 |
| 4 | 180 | 129 | 71,7 | 28 | 15,6 | 8 | 4,4 | 15 | 8,3 |
| 5 | 71 | 59 | 83,1 | 7 | 9,9 | 2 | 2,8 | 3 | 4,2 |
| 6 | 40 | 24 | 60 | 3 | 7,5 | 4 | 10 | 9 | 22,5 |
| 7 | 42 | 25 | 59,5 | 8 | 19 | 1 | 2,4 | 8 | 19 |
| 8 | 56 | 44 | 78,6 | 5 | 8,9 | 3 | 5,4 | 4 | 7,1 |
| 9 | 122 | 98 | 80,3 | 9 | 7,4 | 3 | 2,5 | 12 | 9,8 |
| 10 | 75 | 39 | 52 | 6 | 8 | 19 | 25,3 | 11 | 14,7 |
| Total | 720 | 481 | 66,8 | 100 | 13,9 | 49 | 6,8 | 90 | 12,5 |

Os resultados das médias e medianas da CCS/mL de leite das amostras de leite individuais, em cada propriedade estão apresentados na tabela 2. Ao avaliar individualmente cada propriedade observa-se grande variação entre elas, mas de acordo com o limite estabelecido como normalidade nos Estados Unidos que é de 10^6 CCS/mL de leite (18), os resultados são favoráveis. Esta variação nos resultados deve estar relacionada com as características dos sistemas de produção de cada propriedade, com o manejo sanitário adotado e com as diferenças entre o número mínimo de animais em lactação de cada propriedade, pois foram examinadas todas as cabras em lactação de cada uma delas, pois o objetivo principal era avaliar a ocorrência de mastite em cada propriedade.

Tabela 2. Médias e medianas da CCS/mL de leite nas amostras de leite caprino individual, em propriedades dos estados de São Paulo e Minas Gerais, 2011.

| Propriedades | nº de tetos | CCS/mL de leite (x 1000 cél/mL) | |
|--------------|-------------|---------------------------------|---------|
| | | Média | Mediana |
| 1 | 104 | 364,6 | 43 |
| 2 | 10 | 899,5 | 767 |
| 3 | 20 | 346,5 | 12 |
| 4 | 180 | 131,9 | 43 |
| 5 | 71 | 412,9 | 280 |
| 6 | 40 | 267,1 | 67,5 |
| 7 | 42 | 119,8 | 81 |
| 8 | 56 | 243,5 | 114 |
| 9 | 122 | 388,9 | 207,5 |
| 10 | 75 | 764,3 | 700 |

A análise da tabela 3, mostra que à medida que aumenta o grau de reação do CMT, há uma tendência ao aumento na CCS/ml de leite, o que é esperado nas mastites subclínicas, mostrando a importância de se estabelecer ao CMT positividade a partir da reação 3+, reforçando a necessidade de estudos não somente com a CCS/mL de leite eletrônica, mas também microscópica para melhor interpretação dos resultados quanto à infecção, o que permite ainda avaliar a resposta celular de polimorfonucleares nas amostras de leite.

Quanto à microbiota encontrada, *S. aureus* foi o patógeno de maior ocorrência (34,6%), seguido pelo *S. epidermidis* (26%), *Staphylococcus caprae* (25%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,7%), *Corynebacterium bovis* (2,9%), *Streptococcus uberis* (1,9%), *Escherichia coli* (1,9%) e *Micrococcus* spp. (1%). Além da múltipla etiologia encontrada, característica das mastites, ocorreram diferenças quanto ao percentual de patógenos isolados entre as propriedades, aspecto relevante na epidemiologia desta afecção independentemente das espécies, fato também reportado por Meirelles et al. (2) para a espécie caprina.

Trabalho realizado no Reino Unido (4) com 159 cabras demonstrou que 53 apresentavam mastite subclínica, sendo que ECN foram os micro-organismos mais frequentes (47%), seguido pelo *Corynebacterium bovis* (31%) e *Staphylococcus aureus* (13%). O isolamento de ECN no presente trabalho corrobora com muitos autores que relatam a participação destes micro-organismos nas infecções intramamárias em cabras leiteiras (2,7). Estudo realizado com 70 cabras no Brasil por Da Silva et al. (3) revelou ECN em 60% das

amostras, sendo *S. warneri* encontrado com maior frequência, seguido por *S. aureus* (37%), valor muito próximo ao encontrado no presente estudo (34,6%).

Tabela 3. Estatística descritiva dos valores de CCS segundo o grau de reação ao CMT, de amostras de leite caprino, com mastite subclínica em propriedades dos estados de São Paulo e Minas Gerais, 2011.

| Estatística | Valores de CMT | | |
|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| | + | ++ | +++ |
| N | 96 | 42 | 86 |
| Mínimo | 0 | 2 | 5 |
| Máximo | 3537 | 1448 | 6104 |
| Mediana | 46 ^a | 146 ^b | 402,5 ^c |
| P25 | 17 | 88,8 | 126,8 |
| P75 | 142,3 | 283,5 | 879,5 |
| Média | 183,8 | 273,3 | 725,3 |
| Média geométrica | 56,3 | 133,2 | 335,9 |

Valores de mediana seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os escores de CMT, pelo teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$.

O estudo de Mota et al. (19) avaliou a etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro de bactérias isoladas de leite de cabras com mastites, procedentes da região metropolitana do Recife - PE, e revelou como principais patógenos, linhagens de *Staphylococcus* spp.

Ainda que alguns autores considerem os ECN menos importantes na etiologia das mastites caprinas, Sheldrake et al. (20) demonstraram que a CCS de caprinos infectados com ECN foi mais alta do que a de animais não infectados e Dulin et al. (21), também consideram os ECN como patógenos de importância nas infecções intramamárias de caprinos.

A relevância dos ECN como patógenos na glândula mamária é bastante discutida, mas tem-se demonstrado em diferentes pesquisas que estes micro-organismos vem assumindo grande importância nas mastites, frequentemente como agentes causadores de mastites subclínicas (3,4,6).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que nas propriedades estudadas, a prevalência de mastites subclínicas é elevada, havendo uma microbiota variável, sendo *S. aureus* o principal patógeno. Não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre o CMT e a CCS/mL de leite, entretanto deve-se considerar o aumento significativo da CCS nas amostras de leite positivas com reação +++ ao CMT.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro da bolsa de Iniciação Científica Processo 2006/07123 e aos bolsistas de Iniciação Científica: Daniel da Silva Penachio e Felipe Laurino, pelo auxílio nas coletas das amostras de leite.

REFERÊNCIAS

1. Langoni H, Da Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Rev Bras Med Vet.* 1998;20:204-9.
2. Meirelles LR, Gottschalk S, Da Silva AV, Cabral KG, Langoni H. Monitoramento microbiológico e avaliação de provas diagnósticas na mastite caprina. *Napgama.* 1999;6:17-9.
3. Da Silva ER, Siqueira AP, Martins JCD, Ferreira WPB, Da Silva N. Identification and in vitro susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin Res.* 2004;55:45-9.
4. Hall SM, Rycroft AN. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. *Vet Rec.* 2007; 160:19-22.
5. Anderson DE, Hull BL, Pugh DG. *Enfermidades da glândula mamária.* In: Pugh DG. *Clínica de ovinos e caprinos.* São Paulo: Roca; 2005.
6. Langoni H, Domingues PF, Baldini S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev Bras Cienc Vet.* 2006;31:51-4.
7. Mendonça A, Valentim R, Maurício R, Cardoso M, Correia T, Coelho A. Mastites subclínicas em cabras serranas. Resultados preliminares. *Rev Port Cienc Vet.* 2007;6:17-9.
8. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Res.* 1994;77:2103-12.
9. Andrade PVP, Souza MR, Borges I, Penna CFAM. Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001;53:169-75.
10. Schuppel H, Schwoppe M. Diagnosis of mastitis in goats using the California Mastitis Test and measurement of electric conductivity. *Arch Lebensmittelhyg.* 1998;49:61-4.
11. Barcellos TFS, Silva N, Marque Júnior AP. Mastite caprina em rebanhos próximos a Belo Horizonte - Minas Gerais. I - Etiologia e sensibilidade a antibiótico. II - Métodos de diagnóstico. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1987;39: 307-15.
12. Zeng SS, Escobar EN. Comparisons of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Rumin Res.* 1996;21:30-4.
13. Schalm GN, Noorlander DD. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J Am Med Assoc.* 1957;130:199-204.
14. National Mastitis Council. *Laboratory handbook on bovine mastitis.* Arlington: The National Mastitis Council - NCM; 1999.
15. Quinn PJ, Carter ME, Markey B. *Mastitis. Clinical veterinary microbiology.* London: Mosby-Year Book Europe Limited; 1994.

16. Statistical Analysis System. SAS User's Guide: statistics. Cary: SAS Institute Inc.; 2001.
17. Perrin GG, Mallereau MP, Lenfant D, Baudry C. Relationship between California Mastitis Test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Rumin Res.* 1997;26:167-70.
18. Paape MJ. Situation regarding the legal limit for somatic cell counts for goats in the United States, 2000. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Goats, France; 2000, Tours. Tours; 2000. p.755-6.*
19. Mota RA, De Castro FJC, Da Silva LBG, Oliveira AAF. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Hora Vet.* 2000;19(114):26-9.
20. Sheldrake RF, Hoare RJT, Woodhouse VE. Relationship of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Res.* 1981;48:393-403.
21. Dulin AM, Paape MJ, Schultze WD, Weinland BT. Effect of parity, stage of lactation and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *J Dairy Sci.* 1983;66:2426-33.

Recebido em: 26/04/11

Aceito em: 28/02/12