



Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell[®] no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros¹

(Microbiological examination, California Mastitis Test and Somaticell[®] evaluation of subclinical mastitis diagnosis in dairy cows)

"Artigo Científico / Scientific Article"

ES Medeiros^(*), JW Pinheiro Junior, RM Peixoto, AP Silva Filho, EB Faria, RA Mota

Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-PE/Brasil.

Resumo

Objetivou-se analisar a sensibilidade, especificidade e concordância entre o California Mastitis Test (C.M.T.), o exame microbiológico e o Somaticell[®] no diagnóstico da mastite subclínica de vacas leiteiras. As amostras (n = 308) foram simultaneamente avaliadas nos três testes e das amostras analisadas 65,6% apresentaram reação ao CMT (escores +, ++, +++), sendo que o maior percentual (38,3%) obtido foi para o escore +++ e o segundo (34,4%) correspondeu aos casos negativos. No exame microbiológico do leite obteve-se uma positividade de 74,4%, isolando-se, como agentes mais frequentes, o *Staphylococcus spp* (69,9%), *Streptococcus spp* (11,0%) e *Corynebacterium spp* (9,6%). No Somaticell[®] verificou-se que 62,7% das amostras apresentaram reação positiva e que 37,3% delas evidenciaram resultado negativo. Os resultados permitem concluir que o Somaticell[®] é um método rápido e prático, e apresenta resultados satisfatórios na detecção de amostras positivas ao exame microbiológico, podendo ser recomendado como teste de triagem para o diagnóstico de casos individuais de mastite subclínica.

Palavras-chave: leite, microrganismos, células somáticas.

Abstract

The goal of this research was to analyze the sensibility, specificity and agreement among the California Mastitis Test (C.M.T.), the microbiological examination and the Somaticell[®] in the diagnosis of the subclinical mastitis in dairy cows. The samples (n = 308) were simultaneously evaluated in the three tests and from the analyzed samples 65.6% showed reaction to the CMT (scores +, ++, +++), being the higher percentage (38.3%) obtained for the score +++ and the second (34.4%) corresponded to the negative cases. In the milk microbiological examination it was obtained 74.4% of positive cases, being isolated as more frequent agents *Staphylococcus spp* (69.9%), *Streptococcus spp* (11.0%) and *Corynebacterium spp* (9.6%). In Somaticell it was found that 62.7% of the samples showed positive reaction and 37.3% showed negative results. The results allow to conclude that Somaticell[®] is a fast and practical method, presents satisfactory results in the detection of positive samples for microbiological examination and may be recommended as a screening test for the diagnosis of individual cases of subclinical mastitis.

Key-words: milk, microorganisms, somatic cells.

Introdução

Com o crescimento do número de laticínios no Brasil e conseqüente competi-

tividade entre seus produtos no mercado, torna-se importante a obtenção de alimentos com qualidade (BRABES et al., 1999). O leite

⁽¹⁾Trabalho extraído da Monografia da primeira autora apresentado à Disciplina Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (rinaldo.mota@hotmail.com).

^(§)Recebido em 05/06/07 e aceito em 24/01/08.

e derivados têm sido implicados em surtos de toxinfecções alimentares (BUYSER et al., 2001; VERAS et al., 2003) e podem estar associados a doenças dos animais de produção, como a mastite que tem como principais agentes etiológicos, bactérias, principalmente, do gênero *Staphylococcus* (FUEYO et al., 2005).

A mastite ocasiona modificações patológicas no tecido glandular e uma série de alterações físicas e químicas do leite e merece destaque em virtude de causar prejuízos relacionados ao descarte do produto, queda na produção, gastos com antibióticos e, eventualmente, o descarte do animal (BRITO e BRITO, 1998). As alterações mais freqüentes observadas no leite são a descoloração, aparecimento de coágulos e o aumento no número de leucócitos (FREITAS et al., 2005).

Segundo o IDF (1984) há pouco mais de três décadas, uma glândula mamária era considerada normal quando não se isolava microrganismos patogênicos e a Contagem de Células Somáticas (CCS) possuía valor abaixo de 500.000 cel/mL. Contudo, os critérios usados para definir o estado sanitário do úbere têm variado e a interpretação para diagnóstico de mastite vem mudando ao longo do tempo.

De acordo com Bouchot et al. (1985), o diagnóstico da mastite clínica é realizado pelos sinais clínicos, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, pus ou sangue. Enquanto a mastite subclínica é diagnosticada por exames baseados no conteúdo celular do leite, como California Mastitis Test (CMT), Whiteside, condutibilidade elétrica, CCS, Wisconsin (WMT), entre outros (COSTA, 1998).

O exame microbiológico é o método definitivo para o diagnóstico porque revela o agente etiológico específico e permite escolher a terapêutica e profilaxia adequada (CORRÊA e CORRÊA, 1992). A CCS, que vem sendo realizada por laboratórios da Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite, com o objetivo de monitorar a qualidade do leite e a situação do rebanho leiteiro do Brasil.

A CCS do leite proveniente de animais sadios é normalmente menor do que 300.000 cel/mL (FONSECA e SANTOS, 2000). A CCS é um critério muito utilizado para indicar a saúde do úbere e a qualidade do leite, sendo uma importante ferramenta para monitorar o leite de vacas individualmente ou de rebanhos (IDF, 1995).

Segundo Bordolla (2007), o Somaticell® é um indicador da CCS do leite, sendo utilizado no diagnóstico de vacas com mastite subclínica em programas de gerenciamento da mastite em rebanhos leiteiros e no gerenciamento da qualidade do leite do rebanho através da análise do leite dos tanques de expansão ou latões.

Considerando a importância desta enfermidade e a busca de métodos de diagnóstico práticos e confiáveis objetivou-se analisar a sensibilidade, especificidade e concordância entre o exame microbiológico, C.M.T. e Somaticell® no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras na Região Metropolitana do Recife.

Material e Métodos

Foram analisadas seis propriedades de exploração leiteira nos Municípios de Camaragibe e São Lourenço, localizadas na Região Metropolitana do Recife.

Os rebanhos eram constituídos de animais mestiços, com idade variável, em diferentes estágios de lactação, sendo criados em sistema intensivo ou semi-intensivo. Os animais apresentavam boa condição corporal, recebiam concentrado e volumoso, além de sal mineral e água *ad libitum*.

Foram colhidas 308 amostras de leite para a realização dos exames microbiológico, CMT e Somaticell®. Após prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio do teto com álcool a 70° GL colheu-se aproximadamente 10 mL de leite em frascos com tampa rosqueada, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e do quarto mamário. Imediatamente depois foram encaminhados ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

No laboratório, as amostras foram submetidas ao CMT, sendo classificadas em negativas e positivas (+, ++, +++), conforme Schalm e Noorlander (1957).

O Somaticell® foi realizado de acordo com instruções do fabricante, entretanto, extrapolou-se a indicação para uso em baldes ou tanques e realizou-se o exame por quarto mamário para se obter uma análise comparativa entre os testes. Para a interpretação dos resultados foram utilizadas cores correspondentes ao número de células somáticas, sendo verde (até 200.000 células somáticas), amarelo (entre 200.000 e 400.000 células somáticas), laranja (entre 400.000 e 1.200.000 células somáticas) e vermelho (acima de 1.200.000 células somáticas).

A lactocultura foi realizada em placas contendo ágar base acrescido de 8% (v/v) de sangue ovino desfibrinado. As placas foram incubadas em aerobiose a 37° C, em estufa microbiológica e analisadas após 24, 48 e 72 horas.

Foram observadas as características de crescimento das colônias em placa, como produção de hemólise e pigmento e características morfo-tintoriais, utilizando-se o método de coloração de Gram (QUIN et al., 1994).

Para análise estatística de sensibilidade e especificidade entre os testes, comparando-os com o padrão ouro que no estudo será o exame microbiológico, classificou-se os resultados do CMT em negativo, quando a amostra apresentava-se homogênea e positiva a partir do escore 3, que equivale a + quando a amostra apresentava ligeira viscosidade. Para interpretação do somaticell® considerou-se negativa a coloração verde e positiva a partir da coloração amarela.

A análise dos dados foi realizada com a utilização de técnicas de estatística descritiva (distribuições absoluta e relativa), segundo Sampaio (1998).

Para o cálculo do índice Kappa (análise da concordância entre os testes analisados) utilizou-se o Win Episcopo 2.0, interpretando o nível de concordância, onde:

Kappa > 0,8 (concordância quase perfeita – excelente); kappa = 0,61 a 0,8 (concordância substancial – muito boa); kappa = 0,41 a 0,6 (concordância moderada – boa); k = 0,21 a 0,4 (concordância razoável – média); k = 0 a 0,4 (concordância fraca – ruim) (TRUESFIELD, 1986).

Resultados e Discussão

Em relação aos resultados obtidos no CMT, observou-se que 65,5% das amostras apresentaram mastite subclínica (escores +, ++ e +++). O maior percentual (38,3%) obtido foi para o escore +++ e o segundo (34,4%) correspondeu aos casos negativos conforme resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado do diagnóstico da mastite subclínica segundo o CMT, em amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

CMT	n	%
Negativo	106	34,4
+	33	10,7
++	51	16,6
+++	118	38,3
Total	308	100,0

Este percentual é alto quando comparado a estudos realizados em outros Estados, 11,90%, 40,40%, 42,82%, 47,9%, 54%, 39,8% (NADER FILHO et al., 1985; VIANNI et al., 1992; BRANT e FIGUEIREDO, 1994; SOUSA et al., 1996; ANDRADE, 1998).

Das 308 amostras submetidas ao exame microbiológico, 79 (25,6%) foram consideradas negativas e 229 (74,4%) positivas. Os principais microrganismos isolados foram *Staphylococcus* spp. (69,9%), seguido de *Streptococcus* spp. (11,0%), *Corynebacterium* spp. (9,6%) e *Bacillus* spp. (6,6%). Os demais microrganismos isolados somaram percentual de 2,9% (Tabela 2).

Em relação aos microrganismos isolados, observou-se uma predominância dos agentes contagiosos (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Corynebacterium* spp)

em relação aos microrganismos ambientais que foram isolados em menor percentual. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados na Região Agreste do Estado de Pernambuco, onde os autores trabalharam com amostras de leite de vacas com mastite subclínica (FREITAS et al., 2005). Ainda nesta região, os microrganismos mais freqüentemente isolados em casos de mastite bovina foram o *Staphylococcus* spp (32,6%) e *Corynebacterium* spp (13,2%) (SÁ et al., 2000).

Tabela 2 - Microrganismos isolados em amostras de leite de vacas com mastite subclínica procedentes de seis propriedades dos Municípios de Camaragibe e São Lourenço, 2006.

Microrganismos isolados	n	%
<i>Staphylococcus</i> spp	160	69,9
<i>Streptococcus</i> spp	25	11,0
<i>Corynebacterium</i> spp	22	9,6
<i>Bacillus</i> spp	15	6,6
Cocobacilo Gram negativo	4	1,7
Cocobacilo Gram positivo	1	0,4
<i>Micrococcus</i> spp	1	0,4
<i>Candida</i> spp	1	0,4
Base	229	100

Os altos índices de mastite por *Staphylococcus* spp observados neste estudo, encontram respaldo na literatura nacional, pois valores de 57,17% e 58,72% também foram relatados por Brant e Figueiredo (1994) e Langoni (1991). Nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, o *Staphylococcus* spp (34,09%) também foi o agente mais prevalente em casos de mastite bovina (COSTA et al., 1995).

De acordo com Fonceca e Santos (2000), as mastites causadas pelo *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* destacam-se como patógenos principais envolvidos nas mastites contagiosas. Relatam ainda, que as mastites causadas pelo *Staphylococcus aureus* apresentam-se, geralmente, sob a forma subclínica e determi-

nam grande aumento na CCS do leite.

As diferenças encontradas entre os resultados dos diversos trabalhos quanto à posição e freqüência dos agentes isolados podem ser atribuídas a fatores genéticos como raça e susceptibilidade individual. É possível também responsabilizar questões ambientais, como sistema de criação, manejo, higiene e nível de exposição e ainda à característica do agente, como patogenicidade, invasibilidade, infecciosidade e contagiosidade, o que reafirma a complexidade etiológica da doença e seu aspecto multifatorial (ANDRADE, 1998).

Os resultados do Somaticell® encontram-se na Tabela 3. Observou-se que o maior percentual (35,7%) para as 308 amostras analisadas correspondeu à cor verde, seguida das cores vermelha (32,1%), laranja (23,1%) e amarela (7,5%).

Tabela 3 – Resultado do Somaticell® em amostras de leite de vacas com mastite subclínica procedentes de seis propriedades dos Municípios de Camaragibe e São Lourenço, 2006.

Avaliação dos resultados pelo exame Somaticell®	n	%
Até 200.000 células somáticas (verde)	115	37,3
Entre 200.000 e 400.000 células somáticas (amarelo)	23	7,5
Entre 400.000 e 1.200.000 células somáticas (laranja)	71	23,1
Acima de 1.200.000 células somáticas (vermelho)	99	32,1
Total	308	100,0

Diante destes resultados observa-se que 32,1% (vermelho) das amostras analisadas apresentavam uma qualidade muito baixa, estimando-se uma perda na produção de leite superior a 18%, destacando-se ainda a quantidade de amostras (23,1%) que se encontravam na cor laranja, onde o leite é considerado com qualidade comprometida e a

perda na produção é estimada entre 5 e 8%.

Na Tabela 4 observa-se que a sensibilidade do CMT em relação ao exame microbiológico é de 77,7% e a especificidade é de 69,6%. Entre as avaliações realizadas ocorreram 233 coincidências entre os exames CMT e microbiológico, sendo que a maioria (178) foi de resultados positivos nos dois exames. Das 75 amostras não coincidentes, 24 foram positivas ao CMT e negativas ao exame microbiológico e 51 foram negativas ao CMT e positivas pelo exame microbiológico. A concordância entre estes dois testes foi classificada como regular.

Tabela 4 – Avaliação do exame CMT segundo o resultado do exame microbiológico, em amostras de leite de vacas com mastite subclínica procedentes de seis propriedades dos Municípios de Camaragibe e São Lourenço, 2006.

Resultados do CMT	Exame microbiológico						Kappa
	Positivo		Negativo		Grupo total		
	n	%	n	%	n	%	
Positivo	178	77,7	24	30,4	202	65,6	0,430
Negativo	51	22,3	55	69,6	106	34,4	
Total	229	100,0	79	100,0	308	100,0	

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice kappa do Somaticell® frente ao exame microbiológico e CMT. encontram-se na Tabela 5.

A concordância entre os testes analisados foi classificada como fraca. Verificou-se que a sensibilidade do Somaticell® em relação ao exame microbiológico é de 99,12%, enquanto que a especificidade é de apenas 3,8%. Das 308 avaliações realizadas ocorreram 230 coincidências entre os exames Somaticell® e o exame microbiológico, sendo que a maioria (227 casos) foi de resultados positivos. Das 78 amostras não coincidentes, 76 foram positivas pelo Somaticell® e negativas ao exame microbiológico.

Tabela 5 – Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Esp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e índice Kappado exame microbiológico (Micro), C.M.T. em relação ao Somaticell®, em amostras de leite de vacas com mastite subclínica procedentes de seis propriedades dos Municípios de Camaragibe e São Lourenço, 2006.

Teste	Sens	Esp	VPP	VPN	Kappa
Micro	99,12	3,80	74,92	60,00	0,042
C.M.T.	99,51	3,78	66,34	80,00	0,042

Quando o Somaticell® foi comparado ao CMT, observou-se uma sensibilidade de 99,51% enquanto que a especificidade é de apenas 3,8%. Verificou-se a ocorrência de 205 coincidências entre o Somaticell® e o CMT, sendo que a maioria (201) das amostras foi positiva nos dois exames. Das 103 amostras não coincidentes, 102 foram positivas pelo Somaticell® e negativas ao CMT. Costa et al. (2005), ao avaliarem valores de sensibilidade e especificidade, além do índice Kappa entre o C.M.T. encontraram, respectivamente, valores de 92,0%, 71,0% e 0,62.

Ainda de acordo com estes autores existe uma preocupação entre os pesquisadores para o estabelecimento de parâmetros, de tal forma, que propiciem uma interpretação adequada no diagnóstico e sejam igualmente úteis na avaliação da efetividade das medidas de controle que sejam implementadas nas propriedades leiteiras para se atingir as metas de qualidade do leite.

Métodos de diagnóstico que forneçam resultados rápidos e confiáveis são necessários para monitoramento do leite, tendo em vista ter sido estabelecido que a partir de 2005 a CCS máxima permitida no leite cru refrigerado será de 1.000.000 cel/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, tal padrão legal é válido até 2010 para as regiões Norte e Nordeste, quando diminuem para $7,5 \times 10^5$ cels/mL (BRASIL, 2002).

Conclusão

O Somaticell® apresenta resultados satisfatórios na detecção de amostras positivas ao exame microbiológico, podendo ser recomendado como teste de triagem para o diagnóstico de casos individuais de mastite subclínica causada por agentes contagiosos ou ambientais.

Referências

ANDRADE, M.A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **A Hora Veterinária**, v.28, n.1, p.29-42, 1998.

BOUCHOT, M.C. et al. Diagnostic bacteriologique des infections mammaires des bovins. **Recueil Médecine Vétérinaire**, v.61, p.567-577, 1985.

BORDOLLA, C.C. Métodos de detección de las mastitis bovina. **Revista Eletrónica de Veterinaria**, v.8, n.9, p.1-17, 2007. Disponível em <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet.html>. Acesso em: 10 de setembro de 2007.

BRABES, K.C.S. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, n.3, p.4-10, 1999.

BRANT, M.C.; FIGUEIREDO J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.6, p.596-596, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, tipo B, tipo C, pasteurizado e cru refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de setembro de 2002. Seção 3. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/das/dispoa/in51.htm>. Acesso em: 10 de setembro de 2007.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Programa de controle das mastites causadas por microorganismos contagiosos e do ambiente.

Juiz de Fora: Embrapa, 1998. 25p. (Documentos 71).

BUYSER, M.L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. **Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843p.

COSTA, E.O. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, p.156-159, 1995.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O. et al. Diagnóstico de mastite bovina subclínica bovina: sensibilidade, especificidade e análise de concordância (Kappa) da contagem eletrônica de células somáticas (CCS) e CMT. **Revista Napgama**, v.8, n.1, p.7-11, 2005.

FONSECA, L. F.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FUEYO, J.M. et al. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. **Microbes and Infection**, v.7, n.2, p.187-194, 2005.

IDF - International Dairy Federation. Recommended methods for somatic cell counting in milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.168, n.19, 1984.

IDF - International Dairy Federation. **Enumeration of somatic cells**. 1995. 8p. (Bulletin. n.148a).

LANGONI H. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, n.6, p.507-515, 1991.

NADER FILHO, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na Região de Ribeirão Preto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, n.2, p.53-56, 1985.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolf, 1994. 648p.

SÁ, M.E.P. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.100-1003, 2000.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte:UFMG, 1998. 221p.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.130, n.5, 1957.

SOUSA, R.M. et al. Estudo comparativo entre o exame bacteriológico e métodos indiretos para detecção da mastite bovina subclínica, p. 122. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1996, Goiana. **Anais...** Goiana, 1996. p. 251.

TRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. London: Butterworth, 1986, 273p.

VERAS, J.F. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.17, p.218, 2003.

VIANNI, M.C.E. et al.. Frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção Láctea. **Arquivos Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p. 113-9, 1992.