

Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina¹

Luiz Francisco Zafalon^{2*}, Antonio Nader Filho³, José Victor de Oliveira⁴ e Flávio Dutra de Resende⁴

ABSTRACT. Zafalon L.F., Nader Filho A., Oliveira J.V. & Resende F.D. 2005. [Electrical conductivity and chloride concentration of milk as auxiliary diagnostic methods in bovine subclinical mastitis.] Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25(3):159-163. Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FACVJ, Unesp - Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: zafalon@iz.sp.gov.br

Electrical conductivity measured by a hand-held meter and chloride concentration of milk were studied as auxiliary methods for diagnosis of bovine subclinical mastitis in the identification of affected mammary quarters where *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium* sp were later isolated. Tests were made during 2 years in Holstein cows of a dairy farm producing type C milk, where milking was performed once a day. Sensitivities of electrical conductivity and chloride concentration tests from mammary quarters, where *Corynebacterium* sp was isolated (65.3% and 78.3%, respectively), were superior to the found in mammary quarters where *S. aureus* was identified (55.4% and 68.2%, respectively). The efficacies of the two diagnostic tests were similar. Statistical significance was demonstrated with regression analysis of both tests of healthy mammary quarters and subclinical mastitis quarters infected with *Staphylococcus aureus*.

INDEX TERMS: Bovine subclinical mastitis, electric conductivity, chloride level, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp.

RESUMO. - Foram estudadas as provas de condutividade elétrica, utilizando-se um medidor manual, e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares para o diagnóstico da mastite subclínica bovina na identificação de quartos mamários doentes em que *Staphylococcus aureus* e microrganismos do grupo *Corynebacterium* foram isolados posteriormente. Os exames foram realizados durante o período de dois anos, em animais da raça Holandesa, em propriedade rural produtora de leite do tipo C, onde a ordenha era realizada uma vez ao dia. A sensibilidade das provas de condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do

leite originado dos quartos mamários em que foram isolados o *Corynebacterium* sp (65,3% e 78,3%, respectivamente) foi superior à encontrada para os quartos mamários em que o *Staphylococcus aureus* foi identificado (55,4% e 68,2%, respectivamente). As eficiências das duas provas diagnósticas foram semelhantes. Foi demonstrada significância estatística nas análises de regressão das duas provas acompanhadas para os quartos mamários sadios e quartos com mastite subclínica por *Staphylococcus aureus*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite subclínica bovina, condutividade elétrica, teor de cloretos, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium*.

INTRODUÇÃO

O leite tem sua composição e qualidade alteradas quando oriundo de vacas com mastite subclínica bovina, com intensidade que depende da resposta inflamatória do animal, dos fatores de virulência do agente etiológico da doença e da extensão do tecido afetado. Vianni & Nader Filho (1990) e Mendonça et al. (1999) destacam a prevalência de *Staphylococcus aureus* nesta forma da doença. Outro agente isolado com frequência de amostras de

¹ Recebido em 1 de julho de 2004.

Aceito para publicação em 2 de fevereiro de 2005.

² Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteado 56, Nova Odessa, SP 13460-000. *Autor para correspondência. E-mail: zafalon@iz.sp.gov.br

³ Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - Jaboticabal, 14884-900, Jaboticabal, SP.

⁴ Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, Colina, SP 14770-000.

leite de quartos com mastite subclínica e considerado uma das principais espécies envolvidas na etiologia da doença é o *Corynebacterium bovis* (Langoni et al. 1991).

A pesquisa do teor de cloretos e da condutividade elétrica do leite são métodos que podem ser utilizados como auxiliares no diagnóstico da mastite subclínica. O íon cloreto está presente na circulação sanguínea e, durante os processos inflamatórios, atravessa os capilares venulares e direciona-se ao lúmen dos alvéolos da glândula mamária, devido ao aumento da permeabilidade vascular e a destruição das junções celulares e do sistema de bomba ativa (El-Naggar 1973). No leite, a condutividade elétrica é determinada pela concentração de íons, sendo os mais importantes o sódio, o potássio e o cloreto. Quando um animal é acometido pela doença, a concentração de potássio no leite diminui, enquanto as concentrações dos íons sódio e cloreto elevam-se devido ao aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos e à destruição dos sistemas de bombeamento iônico, conduzindo ao aumento da condutividade láctea (Nielen et al. 1992).

Segundo Murray et al. (1998), ao ser utilizada a condutividade para diagnosticar a mastite, a fração de leite em que é realizado o exame é fundamental. Uma maior sensibilidade diagnóstica parece ser alcançada ao serem usados os primeiros jatos de leite para serem examinados. Hamann & Gyodi (1999) relatam que após as primeiras frações de leite, a condutividade elétrica diminui.

Segundo Hillerton & Walton (1991), a prova da condutividade apresentou deficiência em detectar a mastite subclínica quando o agente envolvido era *Streptococcus uberis*, o mesmo não acontecendo com *Staphylococcus aureus*. É salientado por estes autores que os quartos infectados por *S. uberis* dificilmente seriam diagnosticados por outra técnica que não fosse o exame microbiológico e são recomendados mais estudos com outros patógenos.

Os objetivos de um teste diagnóstico no contexto do controle e erradicação da doença animal são identificar rebanhos doentes, além de animais infectados dentro dos rebanhos. Durante a fase inicial de um programa de controle, a sensibilidade de um teste diagnóstico é considerada como a característica mais importante para garantir que todos os animais doentes em um rebanho estejam sendo detectados, a não ser quando se tem uma reduzida prevalência da doença, o que torna a especificidade mais importante e um segundo teste diagnóstico pode ser conduzido para aumentar a capacidade de identificação de animais não doentes (Pfeiffer 1999).

Objetivou-se avaliar a eficiência da condutividade elétrica e do teor de cloretos do leite na identificação de quartos mamários doentes em que *Staphylococcus aureus* e microrganismos do grupo *Corynebacterium* foram isolados em laboratório, posteriormente. Tais agentes bacterianos foram escolhidos pelo fato de *S. aureus* ser amplamente conhecido como um dos principais envolvidos na etiologia infecciosa da doença, assim como as bactérias do gênero *Corynebacterium*, apesar destas, às vezes, causarem reduções das alterações nas características do leite que impossibilitam o diagnóstico pela utilização de métodos auxiliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais faziam parte de uma propriedade rural produtora de leite tipo C com população média de 40 animais durante o período de

estudo, com ordenha realizada mecanicamente, uma vez ao dia, pela manhã, sendo utilizado o sistema de "balde ao pé". A população bovina era constituída por animais da raça Holandesa Preto e Branca, cuja alimentação baseava-se em concentrado (rolão de milho, milho, calcário, fosfato bicálcico, uréia e sulfato de amônia) e pastagens de *Panicum maximum* cultivar Tanzânia.

As vacas em lactação foram acompanhadas por dois anos. As amostras de leite submetidas à condutividade elétrica originaram-se de 554 quartos mamários com isolamento de *S. aureus* e 76 quartos com isolamento de *Corynebacterium* sp, enquanto as amostras de leite submetidas à detecção do teor de cloretos originaram-se de 233 quartos mamários em que houve o isolamento de *S. aureus*, além de outros 43 quartos mamários com isolamento de *Corynebacterium* sp. Foram considerados, também, quartos mamários sem o diagnóstico de quaisquer microrganismos, contralaterais àqueles com mastite subclínica.

As amostras de leite submetidas à condutividade elétrica e à prova do teor de cloretos estão relacionadas com quartos infectados por *S. aureus* e *Corynebacterium* sp, mais os quartos contralaterais sadios. Dessa maneira, o grupo dos quartos em que as amostras de leite foram submetidas à condutividade elétrica originaram-se de 554 quartos mamários, com isolamento de *S. aureus* e sadios, além de 76 quartos com isolamento de *Corynebacterium* sp e sadios, enquanto as amostras de leite submetidas à prova do teor de cloretos originaram-se de 233 quartos mamários em que houve o isolamento de *S. aureus*, mais os quartos sadios, além de outros 43 quartos mamários com isolamento de *Corynebacterium* sp mais os quartos mamários sadios.

A determinação da condutividade elétrica do leite foi efetuada com o medidor portátil MAS-D-TEC® (Wescor, Utah, Estados Unidos). Para tanto, os quartos mamários foram ordenhados orientando-se os jatos de leite diretamente para a abertura superior do medidor. Logo em seguida, pressionou-se um botão localizado na parte frontal do aparelho e instantaneamente a leitura foi realizada por meio de uma escala no visor do mesmo, cujos valores situavam-se entre zero e nove. De acordo com as recomendações do fabricante, considerava-se como sadio o quarto mamário em que o leite demonstrava uma leitura dentro do intervalo de zero a quatro, sugestivo de baixo conteúdo de eletrólitos do leite, enquanto valores iguais ou superiores a cinco eram interpretados como uma indicação de mastite subclínica no quarto mamário testado. Não foram colhidas amostras de leite de quartos utilizados em colheitas anteriores, porém, em algumas colheitas, o leite utilizado foi o de animais já estudados anteriormente.

A detecção do teor de cloretos do leite foi feita colocando-se 10 mL de leite em um béquer e, em seguida, cinco gotas de solução de cromato de potássio a 5%. Após a homogeneização dessa mistura que apresentava uma coloração amarelo-clara, efetuou-se a titulação com solução de nitrato de prata a 0,1N até o ponto de viragem, detectado pelo aparecimento de coloração alaranjado-escura. O volume gasto de nitrato de prata na titulação era multiplicado pelo fator 0,0355, calculando-se a concentração do teor de cloretos existente nas amostras analisadas (Morita & Assumpção 1972). Consideraram-se como positivas para mastite subclínica as amostras de leite com teor de cloretos igual ou superior a 0,16% (Amaral et al. 1988).

Definiu-se (1) a sensibilidade dos testes diagnósticos como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, (2) a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios, e (3) a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico (Medronho & Perez 2002). Foram elaboradas tabelas de acordo com o modelo proposto no Quadro 1, sendo possível calcular as características de cada teste diagnóstico estudado, de acordo com o mencionado a seguir:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Eficiência} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

As colheitas das amostras de leite para os exames microbiológicos foram realizadas após prévia antissepsia dos quartos mamários com algodão embebido em álcool 70%. Foram realizados movimentos a partir do orifício do teto em direção à parte superior externa do mesmo, até o algodão sair totalmente limpo. Aguardava-se a secagem completa do óstio e o leite era colhido em tubos de ensaio esterilizados com tampas rosqueáveis.

As amostras foram encaminhadas até o laboratório, dentro de caixas de material isotérmico sob refrigeração e, então, semeadas sobre a superfície de ágar sangue (Ágar base - Oxoid®, Hampshire, Inglaterra) para a realização do isolamento e identificação das cepas dos microrganismos de acordo com o *National Mastitis Council* (1990) e o Manual de Bacteriologia Sistemática Bergey (Holt et al. 1994). O diagnóstico microbiológico foi definido para validação dos testes diagnósticos estudados (Schmidt & Duncan 1999).

A análise da regressão linear entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica foi realizada para os quartos mamários saudáveis e para os quartos com mastite subclínica por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* sp (Sampaio 1998). O modelo estatístico utilizado para a análise de regressão foi representado pela equação:

$$Y = a + b \cdot x$$

Onde: Y = observação referente ao teor de cloretos (%); a = coeficiente linear da regressão; b = coeficiente de regressão dos valores da condutividade elétrica sobre a resposta Y (teor de cloretos); x = valor da condutividade elétrica.

Quadro 1. Possíveis resultados de um teste diagnóstico para a identificação de uma doença

| Teste | Doença | | Total |
|----------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| | Presente | Ausente | |
| Positivo | a (Verdadeiro positivo) | b (Falso positivo) | a + b |
| Negativo | c (Falso negativo) | d (Verdadeiro negativo) | c + d |
| Total | a + c | b + d | a + b + c + d |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe uma grande diversidade na etiologia infecciosa da mastite. Este fato faz com que os testes diagnósticos para mastite subclínica possam ter comportamentos diferentes de acordo com o microrganismo responsável pela doença, devido à maneira como cada quarto mamário responde à infecção e é afetado por determinado agente etiológico.

Os dados referentes à avaliação da sensibilidade, especificidade e eficiência da condutividade elétrica e da prova do teor de cloretos do leite encontram-se no Quadro 2.

Verificou-se que a condutividade elétrica (65,3%) e o teor de cloretos do leite (78,3%) apresentaram uma maior sensibilidade em quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium* sp, quando comparada com a mastite subclínica por *S. aureus*. O

Quadro 2. Avaliação (%) da condutividade elétrica (CE) e do teor de cloretos do leite como métodos diagnósticos da mastite subclínica bovina por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* sp

| Microrganismo | Teste diagnóstico | Sensibilidade | Especificidade | Eficiência |
|------------------------|-------------------|---------------|----------------|------------|
| <i>S. aureus</i> | CE | 55,4 | 78,1 | 70,1 |
| <i>Corynebacterium</i> | CE | 65,3 | 77,3 | 69,0 |
| <i>S. aureus</i> | Cloretos | 68,2 | 77,7 | 72,6 |
| <i>Corynebacterium</i> | Cloretos | 78,3 | 63,6 | 71,1 |

teor de cloretos apresentou sensibilidade superior à condutividade elétrica para o diagnóstico da mastite subclínica em quartos mamários infectados por *S. aureus* e *Corynebacterium* sp. Quando *S. aureus* estava relacionado com a etiologia da doença, a especificidade do teor de cloretos foi superior à observada para *Corynebacterium*, enquanto a especificidade da condutividade elétrica foi próxima para os dois grupos de microrganismos. As duas provas apresentaram eficiências semelhantes para o diagnóstico da mastite subclínica por *S. aureus* e *Corynebacterium*.

Ressalta-se que o intuito deste trabalho não foi o uso de testes auxiliares para o diagnóstico dos microrganismos responsáveis pela etiologia infecciosa, mas sim uma comparação de dois testes quando identificados agentes etiológicos que podem gerar respostas diferentes por parte de animais com mastite subclínica.

Uma amostra de leite com baixa resistência elétrica denota que a mesma tem alta condutividade elétrica. Shoshani & Berman (1998) sugerem que a resistência elétrica pode ser mais baixa em infecções por *S. aureus* do que naquelas causadas por patógenos considerados como secundários, no caso representados em sua maior parte por espécies do gênero *Micrococcus*, provavelmente devido a diferenças nas relações hospedeiro-parasita.

Salienta-se o fato da condutividade elétrica e do teor de cloretos apresentarem uma maior sensibilidade para *Corynebacterium*, já que se esperaria uma sensibilidade superior para *S. aureus*. A não ser que grande parte dos diagnósticos de mastite por *S. aureus* tenham sido realizados em um período inicial da infecção, em que os danos à glândula mamária ainda não estivessem tão evidentes. Outra questão a ressaltar é que o número de quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium* que foram estudados é inferior àqueles com a doença devido a *S. aureus*. Com um número superior de quartos doentes por *Corynebacterium*, talvez a sensibilidade dos métodos auxiliares utilizados poderia se reduzir para este grupo de microrganismos. Tal diferença no número de quartos mamários estudados com isolamento dos microrganismos deveu-se à prevalência dos mesmos na propriedade, que era superior para *Staphylococcus aureus*.

Segundo Nielen et al. (1992), a condutividade elétrica tem uma baixa sensibilidade para diagnosticar a mastite bovina, talvez mais pelo fato de se usar um teste comparativo incorreto do que ela não ser um bom método diagnóstico. Para Deluyker (1991), a condutividade elétrica poderia ser um melhor teste diagnóstico se fosse comparada com a produção de leite.

Entretanto, na propriedade estudada, não foi demonstrada correlação significativa entre a produção de leite e a condutividade

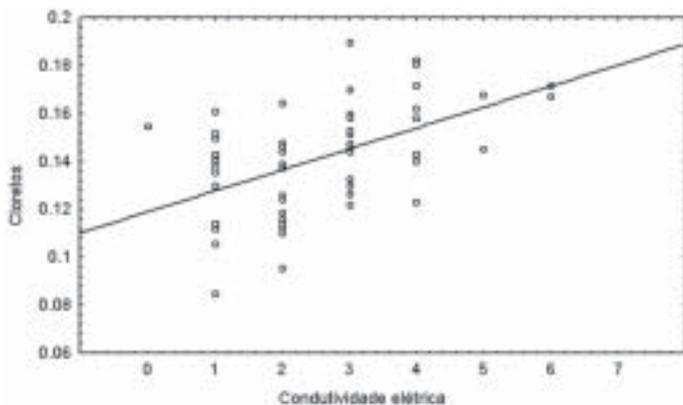


Fig. 1. Representação gráfica da relação linear entre a condutividade elétrica e o teor de cloretos (em %) para os quartos mamários sadios ($p < 0,01$).

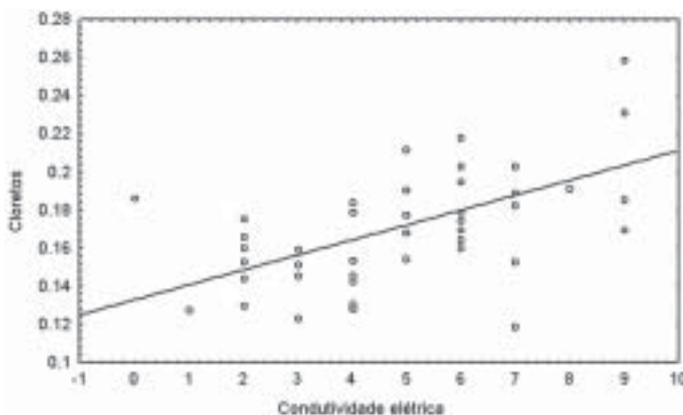


Fig. 2. Representação gráfica da relação linear entre a condutividade elétrica e o teor de cloretos (em %) para os quartos mamários com mastite subclínica por *S. aureus* ($p < 0,01$).

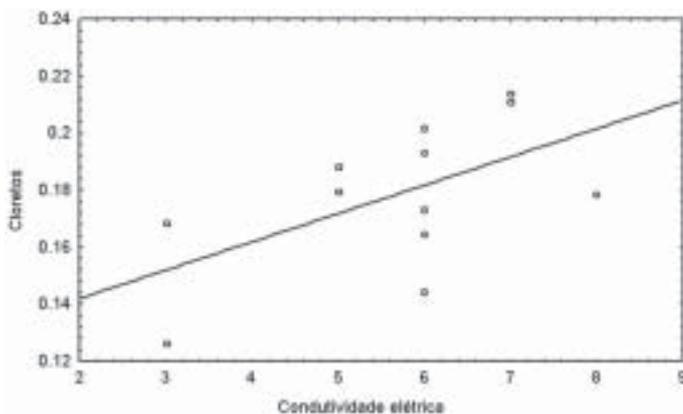


Fig. 3. Representação gráfica da relação linear entre a condutividade elétrica e o teor de cloretos (em %) para os quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium* sp ($p = 0,513$).

elétrica, tanto nos quartos mamários sadios como naqueles com mastite subclínica por *S. aureus* e *Corynebacterium*, quando as duas foram comparadas (observação pessoal). Já McDaniel et al. (1994) relataram correlação positiva, em amostras de leite bovino, entre os resultados obtidos por um detector portátil de

condutividade elétrica, a contagem de células somáticas e a infecção por patógenos.

A escolha do diagnóstico microbiológico como “padrão-ouro” para os exames auxiliares em questão foi para evitar variações que poderiam ser encontradas pela possível diferença de atuação dos grupos de microrganismos aqui estudados no interior da glândula mamária. Caso fossem utilizados outros exames para “padrão-ouro”, não baseados nos achados microbiológicos, maneiras diferentes de ação destes microrganismos no interior da glândula poderiam resultar em interpretações errôneas.

A relação linear entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica para os quartos mamários sadios foi representada pela equação $Y = 0,1191 + 0,0088x$ e pode ser demonstrada pela Fig. 1.

Já a relação linear para os quartos mamários com mastite subclínica por *S. aureus*, entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica, foi demonstrada pela equação $Y = 0,1330 + 0,0078x$ e está representada na Fig. 2.

Por sua vez, a Fig. 3 representa a relação linear entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica para os quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium*, demonstrada pela equação $Y = 0,1223 + 0,0099x$.

As regressões lineares entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica do leite dos quartos mamários com mastite subclínica por *S. aureus* e quartos sadios, foram significativas ($p < 0,01$). A regressão linear entre o teor de cloretos e a condutividade elétrica do leite de quartos mamários infectados por *Corynebacterium* não demonstrou significância ($p = 0,513$), talvez pelo número menor de quartos mamários estudados.

Os métodos estudados apresentaram eficiência semelhante para o diagnóstico quando a mastite subclínica era causada por *S. aureus* e *Corynebacterium*, apesar da maior sensibilidade do teor de cloretos e da condutividade elétrica em quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium* sp.

Agradecimentos. - À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 98/16087-6.

REFERÊNCIAS

- Amaral L.A., Nader Filho A. & Lew B.J. 1988. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. *Ars Vet.* 4(1):105-112.
- Deluyker H.A. 1991. Milk yield fluctuations associated with mastitis. *Flemish Vet. J.* 62(1):207.
- El-Naggar M.A. 1973. Una reacción sencilla para el diagnóstico de la mastitis bovina. *Noticias Med. Vet.* 3:219-225.
- Hamann J. & Gyodi P. 1999. Electrical conductivity in fraction-collected quarter milk samples with low somatic cell counts. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 54(9):487-491.
- Hillerton J.E. & Walton A.W. 1991. Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. *Vet. Rec.* 128(1):513-515.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Williams S.T. 1994. Gram-positive cocci, p.544-551. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Langoni H., Pinto M.P., Domingues P.F. & Listoni F.J.P. 1991. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 43:507-515.
- McDaniel B.T., Anderson K.L. & Wilk J.C. 1994. Evaluation of simple, quick and inexpensive cow-side tests to identify mastitis infections. Annual Report 246, Department of Animal Science, North Carolina State University.

- Medronho R.A. & Perez M.A. 2002. Testes diagnósticos, p.259-270. In: Medronho R.A. (ed.) Epidemiologia. Editora Atheneu, São Paulo.
- Mendonça C.L., Fioravanti M.C.S., Silva J.A.B.A., Souza M.I.L., Eurides D. & Langoni H. 1999. Etiologia da mastite bovina. Vet. Notícias 5(1):107-118.
- Morita T. & Assumpção R.M.V. 1972. Manual de soluções reagentes e solventes. Edgar Blucher, São Paulo. 627p.
- Murray W.W., Williamson J.H. & Henderson H.V. 1998. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. J. Dairy Res. 65:187-198.
- National Mastitis Council. 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. The National Mastitis Council Inc., Arlington, VA. 34p.
- Nielen M., Deluyker H., Schukken Y.H. & Brand A. 1992. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance. J. Dairy Sci. 75(2):606-614.
- Pfeiffer D.U. 1999. Veterinary Epidemiology – An introduction. Royal Veterinary College, University of London, December. 61p.
- Sampaio I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 221p.
- Schmidt M.I. & Duncan B.B. 1999. Epidemiologia clínica e a medicina embasada em evidências, p.183-206. In: Rouquayrol M.Z. & Almeida Filho N. Epidemiologia e Saúde. 5ª ed. Medsi, Rio de Janeiro.
- Shoshani E. & Berman A. 1998. Subclinical mastitis assessed by deviations in milk yield and electrical resistance. J. Dairy Res. 65(1):31-41.
- Vianni M.C.E. & Nader Filho A. 1990. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. Ciência Vet. 4(1):8-9.