

INFLUÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA ESTAFILOCÓCICA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CELULARES DO LEITE¹

Edmar Soares Nicolau², Antonio Nader Filho³, Luiz Augusto do Amaral³
e Oswaldo Durival Rossi Júnior³

ABSTRACT.- Nicolau E.S., Nader Filho A., Amaral L.A., Rossi Júnior O.D. 1996. [**Influence of subclinical staphylococci mastitis on physical, chemical and cellular milk characteristics.**] Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):35-38. Depto Doenças e Inspeção de Carne, Leite e Produtos Derivados, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, "Campus de Itatiaia", Goiânia, GO 74410-000, Brazil.

One hundred twenty-six milk samples from 63 apparently healthy cows, but positive in the California Mastitis Test were submitted to determinations of pH, acidity, density, butter-fat, total solids, non-fat solids, cryoscopic point, caseine level, chloride level and polymorphonuclear leukocytes. Forty-one cows were infected by coagulase-positive *Staphylococcus* and 22 by coagulase-negative *Staphylococcus*. The results obtained in the milk sample analysis from the healthy quarters and infected by coagulase-positive *Staphylococcus* showed variations of all constituents investigated. However only the pH values (F=4.17*) and the polymorphonuclear leukocytes (F=11.35**) showed significant differences. On the other hand, between the milk samples from healthy quarters and infected quarters by coagulase-negative *Staphylococcus*, only the polymorphonuclear leukocytes (F=16.29**) showed significant differences.

INDEX TERMS: Milk, subclinical mastitis, coagulase-positive *Staphylococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*.

SINOPSE.- Foram submetidas às determinações do pH, acidez titulável, densidade, teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópico, teor de cloreto, teor de caseína e às contagens de leucócitos polimorfonucleares, 126 amostras de leite procedentes de 63 vacas aparentemente saudáveis, porém, positivas ao Califórnia Mastitis Test, das quais 41 mostraram-se infectadas por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e 22 por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa. Apesar de ter sido observada a variação de todos os constituintes investigados entre as amostras de leite procedentes de quartos saudáveis e infectados por *Staphylococcus* coagulase positiva,

apenas os valores de pH (F=4,17*) e das contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=11,35**), mostraram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, verificou-se, também, que entre as amostras de leite oriundas de quartos saudáveis e infectados por *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas os valores das contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=16,29**) apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leite, mastite subclínica, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa.

INTRODUÇÃO

Entre as 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros identificados como agentes etiológicos da mastite bovina, especial atenção deve ser dispensada aos cocos catalase e Gram positivos, tendo em vista que estas bactérias tem sido frequentemente isoladas tanto nas formas clínicas como nas subclínicas desta enfermidade (Watts 1988).

¹ Aceito para publicação em 18 de janeiro de 1996.

² Departamento de Doenças e Inspeção de Carne, Leite e Derivados, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, "Campus de Itatiaia", Goiânia, GO 74410-000.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

Dentre os agentes etiológicos pertencentes a este grupo de microrganismos destacam-se os *Staphylococcus* coagulase positiva, principalmente em função da sua elevada ocorrência e patogenicidade. Por outro lado, os *Micrococcus* e outras 19 espécies de *Staphylococcus* representam os outros microrganismos deste grupo, que não evidenciam positividade no teste da coagulase (Kloss 1980).

Embora Braimley & Dodd (1984) tenham considerado os *Staphylococcus* coagulase negativa como pouco patogênicos ou apatogênicos na mastite bovina, vários autores tem reconhecido a sua importância como agentes etiológicos desta enfermidade (Verma 1977, Mardh 1978, Vianni 1986, Watts 1988, Vianni & Nader Filho 1990).

Tendo em vista o exposto e considerando a necessidade de maiores informações a este respeito, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar a influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite secretado pelos quartos afetados.

MATERIAL E MÉTODOS

Propriedades rurais e rebanho bovino

Foram estudados 5 rebanhos produtores de leite tipo B, situados na região do Município de Monte Alto, Estado de São Paulo, com um população de cerca de 700 vacas lactantes da raça holandesa e mestiças, mantidas em sistema semi-intensivo de criação, as quais eram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dias.

California Mastitis Test

Foram submetidas ao California Mastitis Test (Schalm & Noorlander 1957), durante a ordenha da tarde, 658 vacas aparentemente sadias. Entre as 252 fêmeas positivas à esta prova, foram colhidos em tubos de ensaio esterilizados, cerca de 20ml de leite dos quartos reagentes, de acordo com as normas de assepsia propostas por Veisseyre (1972). Após o acondicionamento em caixas de material isotérmico ("isopor"), contendo cubos de gelo, estas amostras eram transportadas para os laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Campus" de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

Isolamento e identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*

As referidas amostras eram semeadas em placas de Petri contendo ágar Baird-Parker e incubadas a 37°C por 24/48 horas, quando procedia-se a verificação da presença de colônias negras, circundadas ou não por halo de precipitação, bem como a realização de esfregaços corados pelo método de Gram e do teste da catalase (American Public Health Association 1976).

As colônias que revelassem a presença de cocos Gram positivos dispostos sob a forma de cachos de uva e que evidenciassem positividade no teste da catalase, eram submetidas à prova da coagulase lenta com plasma de coelho (Holberg 1973). As cepas coagulase negativas eram submetidas, ainda, à prova de oxidação e fermentação da glicose em condições de aerobiose e de anaerobiose, com o intuito de diferenciar os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* (Carter 1988).

Seleção dos animais

A partir da referida identificação, foram selecionadas 63 vacas que apresentavam pelo menos um quarto positivo ao California

Mastitis Test e infectado por cepas *Staphylococcus*, simultaneamente à presença de pelo menos um quarto negativo à referida prova. Deste modo foram selecionadas 41 vacas infectadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e 22 por *Staphylococcus* coagulase negativa.

Amostras de leite

Foram colhidas assepticamente, duas amostras de leite de cada fêmea selecionadas, de modo que cada amostra representasse o produto oriundo dos quartos sadios e infectados, respectivamente. Para tanto, colhiam-se, através de realização de um "pool", cerca de 250ml de leite do(s) quarto(s) sadio(s) e infectado(s), respectivamente.

Análises físico-químicas e celulares

As amostras de leite foram submetidas às determinações do pH, acidez titulável, densidade, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópico (Ministério da Agricultura 1980), teor de cloretos (Amaral et al. 1988), teor de caseína (Wandek et al. 1977) e às contagens de leucócitos polimorfonucleares (Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council 1968).

Método estatístico

Os dados obtidos foram enquadrados em delineamento inteiramente casualizado e submetidos à análise de variância pelo teste F (Gomes 1987).

RESULTADOS

O Quadro 1 mostra a frequência de isolamento de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa entre as 63 fêmeas selecionadas em 5 rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Monte Alto/SP. Verifica-se que as referidas cepas foram isoladas das amostras de leite procedentes de 41 (65,1%) e de 22 (34,9%) fêmeas, respectivamente.

O Quadro 2 mostra os valores médios das determinações físico-químicas e celulares das amostras de leite de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa e determinação do percentual de variação. Apesar de ter sido observada a variação de todos os constituintes

Quadro 1. Frequência de isolamento de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa entre 63 fêmeas selecionadas em 5 rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Monte Alto, São Paulo

Rebanhos	Cepas de <i>Staphylococcus</i>				Total
	Coagulase positiva		Coagulase negativa		
	Nº	%	Nº	%	
A	16	25,4	7	11,1	23
B	6	9,5	6	9,5	12
C	10	15,9	2	3,2	12
D	8	12,7	4	6,4	12
E	1	1,6	3	4,8	4
Total	41	65,1	22	34,9	63

Quadro 2. Valores médios das determinações físico-químicas e celulares do leite de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa e determinação do percentual de variação em 5 rebanhos produtores de leite tipo B na região de Monte Alto, São Paulo

Características físico-químicas e celulares	Amostras de leite de quartos							
	Sadios	Infectados ^a	% Variação	F	Sadios	Infectados ^b	% Variação	F
Acidez (°D)	20,19	19,60	-2,92	0,76 ^{NS}	19,90	19,59	-1,56	0,15 ^{NS}
Densidade	1,0323	1,0311	-0,12	-0,92 ^{NS}	1,0323	1,0311	-0,12	1,96 ^{NS}
Teor de gordura (%)	2,70	2,69	0,37	0,69 ^{NS}	3,20	3,18	-0,62	0,00 ^{NS}
E.S.T. (%)	11,60	11,46	-1,21	0,33 ^{NS}	12,20	12,07	-1,07	0,01 ^{NS}
E.S.D. (%)	8,90	8,76	-1,57	1,49 ^{NS}	9,00	8,98	-0,22	0,56 ^{NS}
Crioscopia (°C)	-0,542	-0,544	-0,37	0,69 ^{NS}	-0,544	-0,547	-0,55	0,15 ^{NS}
Caseína (%)	2,529	2,421	-4,27	1,68 ^{NS}	2,526	2,511	-0,59	0,54 ^{NS}
pH	6,40	6,48	+1,23	4,17*	6,43	6,49	+0,92	1,05 ^{NS}
Teor de cloretos (%)	0,132	0,142	+7,04	3,39 ^{NS}	0,133	0,139	+4,32	0,35 ^{NS}
Leucócitos PMN/ml	282.720	6.636.720	+2.247,45	11,35**	189.966	+3.303.946	1.639,23	16,29**

^a Cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva.

^b Cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

^{NS} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

investigados, verifica-se que entre os quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, apenas os valores médios do pH (F=4,17*) e da contagem de leucócitos polimorfonucleares (F=11,35**) mostraram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, verifica-se, também, que entre os quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas as contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=16,29%) apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise dos dados constantes dos Quadros 1 e 2 demonstra que as amostras de leite procedentes dos quartos infectados por cepas *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa, quando comparadas às dos quartos sadios, apresentaram maiores valores médios nas determinações do pH, teor de cloretos e do número de leucócitos polimorfonucleares. Por outro lado, as referidas amostras apresentaram menores valores médios nas determinações da acidez, densidade, teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, crioscopia e de caseína. Tais achados confirmam as tendências observadas por Cecilia (1980), Ferreiro et al. (1981), Kitchen (1981), Poutrel (1982), Vianni (1986), Timms & Schultz (1987), Amaral et al. (1988), Emanuelson & Wever (1989) e Vianni & Nader Filho (1990).

Os valores inseridos no Quadro 2 revelam que entre os vários constituintes analisados, as contagens de leucócitos polimorfonucleares foram as que apresentaram os maiores percentuais de variação, quais sejam, 2.247,45% e 1.639,23%, respectivamente. Vianni (1986), Timms & Schultz (1987) e Rainard et al. (1990) também constataram este fato, todavia, obtiveram percentuais de variação inferiores, quais sejam, 597,7% e 97,76%, 700,0% e 108,8% e de 1.142,5% e

524,9%, respectivamente. Acredita-se que as diferenças observadas entre os referidos percentuais talvez possam ser atribuídas a vários fatores, dentre os quais destacam-se as distintas características patogênicas das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas dos casos investigados.

Apesar de ter sido verificada a variação de todos os constituintes investigados, quando comparadas às amostras de leite procedentes de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas as contagens de leucócitos polimorfonucleares mostraram diferenças estatisticamente significativas para ambos os grupos de microrganismos, quais sejam, F=11,35% e F=16,29%, respectivamente. Tais achados vêm ratificar as afirmações de vários autores, segundo as quais a quantidade de leucócitos polimorfonucleares presentes no leite, constituiu-se no parâmetro mais seguro para a avaliação do estado sanitário da glândula mamária (Poutrel 1982, Toit et al. 1982, Timms & Schultz 1987, Rainard et al. 1990, Vianni & Nader Filho 1990).

Os achados deste trabalho talvez possam justificar a larga utilização dos métodos auxiliares de diagnóstico da mastite bovina que se fundamentam na avaliação do conteúdo leucocitário do leite, especialmente a do California Mastitis Test, que apesar de ter sido idealizado 39 anos atrás por Schalm & Noorlander (1957), ainda é amplamente empregado a nível de campo em praticamente todos os países do mundo.

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 Veterinária* 4(1): 105-112.
- American Public Health Association 1976. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination*. Washington. 701p.

- Braimley A.J. & Dodd F.H. 1984. Review of the progress of dairy science; mastitis control progress and prospects. J. Dairy Sci. 51: 481-512.
- Carter G.R. 1988. Fundamentos de Bacteriologia e Virologia Veterinária. 3ª ed. Roca, São Paulo. 249p.
- Cecilia A.C. 1980. Enciclopédia de la Inspeccion Veterinária y Analisis de Alimentos. Calpe, Madrid. 1313p.
- Emanuelson V. & Wever P. 1989. Potential of differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. Acta Vet. Scand. 30: 464-474.
- Ferreiro L., Santos E.C., Silva M. 1981. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG 33(1): 36-45.
- Gomes F.P. 1987. Curso de Estatística Experimental. 12ª ed. Piracicaba, São Paulo. 467p.
- Holberg G.Y. 1973. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. Acta Vet. Scand. 45 (Suppl.): 1-144.
- Kitchen B.J. 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk composition changes and related diagnostic test. J. Dairy Res. 48(5): 167-188.
- Kloss W.E. 1980. Natural population of germs *Staphylococcus*. Annu. Rev. Microbiol. 34: 559-592.
- Mardh P.A. 1978. Coagulase negative, novo-biocin-resistant *Staphylococcus* on the skin of animal and man, on meat and milk. Acta Vet. Scand. 19: 243-253.
- Ministério da Agricultura 1980. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II - Métodos físico-químicos. Secretaria Nacional de Defesa Animal, Brasília.
- Poutrel B. 1982. Susceptibility to mastitis: a review of factors related to the cow. Annales Rech. Vét. 13(1): 85-99.
- Rainard P., Ducelliel M. & Poutrel B. 1990. The contribution of mammary infections by coagulase negative *Staphylococcus* to the herd bulk milk somatic cell count. Vet. Res. Commun. 14(3): 193-198.
- Schalm O.W. & Noorlander D.D. 1975. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130(5): 199-204.
- Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council 1968. Direct microscopic somatic cell count in milk. J. Milk Food Technol. 31(11): 350-354.
- Timms L.L. & Schultz L.M. 1987. Dynamic and significances of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J. Dairy Sci. 70: 2648-2657.
- Toit F., Villiers P.A. & Smith A. 1982. Influence of bacterial infection of quarters on milk production and milk composition. S. Afr. J. Anim. Sci. 12(3): 369-374.
- Veisseyre R. 1972. Lactologia Técnica. Acribia, Zaragoza. 634p.
- Verma N.D. 1977. Bovine mastitis and *Staphylococcus epidermidis*. Indian J. Anim. Sci. 47(2): 73-78.
- Vianni M.C.E. 1986. Influência de agentes bacterianos da mastite subclínica bovina sobre as características físico-químicas do leite. Dissertação de Mestrado, Instituto de Veterinária Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro. 113p.
- Vianni M.C.E. & Nader Filho A. 1990. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. Ciênc. Vet. 49(1): 4.
- Wandeck F.A., Barros G.C., Matos Neto P.J. & Silva C.A.B. 1977. Análises do Leite e Derivados. Práticas de Laboratório. Itaguaí, Rio de Janeiro. 145p.
- Watts J.L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16: 41-46.