

California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica

California Mastitis Test (CMT) and whiteside evaluation as indirect diagnosis methods for subclinical mastitis

RIBEIRO JÚNIOR, Edson¹; SILVA, Maria Helena^{2*}; VIEGAS, Simone Assis de Aquino²;
RAMALHO, Elizabeth Juvêncio²; RIBEIRO, Marinaldo Divino³; OLIVEIRA, Flávia
Carolina Souza de⁴

¹Médico Veterinário, Autônomo, Salvador, BA, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva, Salvador, BA, Brasil.

³Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Zootecnia e Extensão Rural, Cuiabá, MT, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Preventiva, São Paulo, SP, Brasil.

*Endereço para correspondência: mhelenar@uol.com.br

RESUMO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar os métodos de diagnóstico CMT e Whiteside, sob o ponto de vista econômico e de eficiência na identificação da mastite subclínica no campo. Por um período de cinco meses, foram coletadas 195 amostras de leite de 50 vacas mestiças de zebuínos com raças européias, perfazendo um total de quatro amostras (uma em cada teta). A análise estatística descritiva foi utilizada para interpretação dos dados. Os métodos CMT e Whiteside indicaram, respectivamente, índice de 53,4% e 40,0% de animais positivos. Dentre os animais positivos, mediante as duas provas, 5,12% apresentaram crescimento bacteriano. O teste de CMT mostrou-se mais sensível e economicamente mais viável como método de diagnóstico de campo, quando comparado com a prova de Whiteside.

Palavras-chave: bovinos, glândula mamária, leite, mamite

INTRODUÇÃO

A mastite bovina – uma das principais doenças do rebanho leiteiro – caracteriza-se por um processo inflamatório do úbere. Sua ocorrência é registrada em todo o mundo, principalmente em rebanhos de

SUMMARY

This study aimed to compare CMT and Whiteside diagnosis methods by considering the economic and efficient identification of subclinical mastitis at field. One hundred and ninety-five milk samples of 50 crossbred (Zebu x European breeds) cows, in a total of four samples (one in each teat), were collected during five months. Data were performed by descriptive statistical analysis. CMT and Whiteside diagnosis methods showed, respectively, 53.4 and 40.0% of positive animals. Among the positive animals, for both methods, it was observed 5.12% of bacteria growth. CMT test was more sensitive and feasible as field diagnosis method compared to Whiteside one.

Keywords: cattle, mamitis, mammary gland, milk

alta produção leiteira. O controle sanitário precário do rebanho bovino leiteiro favorece a ocorrência de altos índices de infecções da glândula mamária. Conseqüentemente, a baixa qualidade do leite consumido pelo homem acarreta sérios problemas à saúde pública e às

indústrias de laticínios e derivados (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

O grande impacto econômico deve ser ressaltado, principalmente, pelas perdas decorrentes de baixa produção de leite, alto custo com tratamento, perda de tetos, honorários veterinários, ou mesmo morte do animal. No Brasil, a alta prevalência da mastite em rebanhos leiteiros representa prejuízo de 12 a 15% na produção. Já na Região Sudeste, onde se encontra a maior bacia leiteira, esses valores variam entre 20 e 71%, respectivamente, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Anualmente, três de cada dez vacas leiteiras apresentam inflamação mamária clinicamente aparente, sendo 7% destes animais descartados por lesões irreversíveis e 1% por morte (SMITH, 2006).

Dados estatísticos sobre a qualidade do leite consumido pela população brasileira ainda são escassos ou indisponíveis do ponto de vista de Saúde Pública. Desta forma, vale ressaltar a importância deste alimento, visando um controle mais efetivo de doenças no homem, em decorrência do consumo de leite cru ou de contaminação por agentes patogênicos.

A mastite é uma doença de difícil controle e erradicação, apesar do grande impacto econômico, sobretudo por sua forma subclínica, que passa despercebida entre os animais do rebanho leiteiro. A frequência das formas clínica e subclínica é um parâmetro consagrado para avaliação do estado sanitário do úbere. Entretanto, o diagnóstico precoce desempenha papel fundamental neste processo. Os testes diagnósticos podem ser realizados no campo ou laboratório: os de campo são mais simples e podem ser realizados diariamente no momento da ordenha, destacando-se a caneca telada e o CMT (California Mastitis Test). O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas do leite, sob a ação de um detergente aniônico capaz de romper a membrana celular. A formação do gel ocorre pela interação dos ácidos nucleicos

celular com o detergente (ROSEMBERG, 1993). É um método de triagem barato, de fácil execução e interpretação, capaz de detectar mastite subclínica, e pode ser realizado no campo. Os métodos diagnósticos mais precisos nem sempre podem ser executados, considerando-se as dificuldades inerentes à rotina de campo e seu alto custo. Os laboratoriais são prova de whiteside, CCS (Contagem de células somáticas), cultura e antibiograma.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar os métodos de diagnóstico CMT e Whiteside, sob o ponto de vista econômico e de eficiência na identificação da mastite subclínica no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na fazenda Regional de Entre Rios/UFBA, no período de 2004 e 2005, quando foram coletadas 195 amostras de leite de 50 vacas. As fêmeas selecionadas para esta pesquisa eram mestiças de raças zebuínas com raças européias.

A coleta das amostras de leite foi realizada após a higiene dos úberes das fêmeas com água e secagem com toalhas de papel. Posteriormente, os canais das tetas foram limpos com álcool a 70%. De cada animal foram coletadas quatro amostras, sendo uma em cada teta, respectivamente, por um período de cinco meses.

As amostras foram coletadas em frascos esterilizados, acondicionadas em caixa térmica de isopor com gelo e imediatamente enviadas ao Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e derivados do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Medicina Veterinária, da Universidade Federal da Bahia.

A metodologia utilizada para o CMT foi a preconizada por Schalm (1957). A reação inflamatória foi caracterizada com base na interpretação (Tabela 1) da reação do leite frente ao regente, considerando-se o teste

negativo quando não houver formação de gel: suspeito, com ligeira precipitação; e positivo, com formação de gel em diferentes escalas.

A prova de Whiteside foi realizada conforme os procedimentos preconizados

por Rosemberger (1993). Em uma placa de vidro de relógio foram colocadas 5 gotas da amostra de leite previamente homogeneizada e, em seguida, adicionadas 2 gotas de NaOH N/1 próximo ao leite.

Tabela 1. Interpretação do Califónia Mastitis Test

Interpretação	Reação
Sem formação de gel	Negativa (-)
Ligeira precipitação	Traços (TR)
Formação de gel	Positiva fraca (+)
Gel mais espesso com mamilo central	Positiva (++)
Gel muito espesso aderido ao fundo da placa	Forte positiva (+++)

Com um bastão de vidro misturou-se o leite à solução de NaOH, agitando-se rapidamente por 15 segundos. A formação de grumos ou consistência filamentosa foi interpretada como reação positiva e a ausência de grumos como negativa.

O exame microbiológico das amostras foi realizado com base em 10 (5,2%) dos animais positivos ao CMT e Whiteside, por meio de crescimento em meio de cultura específico (BRASIL, 2003).

Os dados foram interpretados por meio de análise estatística descritiva (MAGALHÃES & LIMA, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras submetidas ao teste de CMT, 46,6% não apresentaram reação positiva para mastite e 53,4% foram positivas em graus variados (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Resultados observados pela aplicação do California Mastitis Test

CMT	Nº de amostras	%
-	91	46,6
+	44	22,5
++	32	16,4
+++	28	14,5
Total	195	100

Tabela 3. Porcentagem de casos positivos e negativos detectados pelo California Mastitis Test

CMT	Positivos	Negativos	Total
%	53,4	46,6	100
Nº de amostras	104	91	195

Tabela 4. Resultados observados pela prova de Whiteside

Whiteside	Nº de amostras	%
+	78	40
-	17	60
Total	195	100

Das amostras positivas, 30,9% resultaram da ocorrência de mastite subclínica em grau elevado. Essa observação torna-se importante em sistemas de produção, pois reflete a condição de manejo sanitário do rebanho e indica a necessidade de intervir preventivamente. Por outro lado, reflete a sensibilidade do teste na identificação da mastite subclínica ainda na sua fase inicial, visto que 22,5% dos resultados positivos

apresentaram formação de aspecto gelatinoso (+).

A identificação da mastite subclínica nos estágios iniciais permite um controle mais efetivo, e reduz o impacto econômico devido às perdas por descarte do leite contaminado ou com a utilização de medicamentos.

Pelo teste de Whiteside, 40,0% das amostras foram positivas e as demais negativas (Tabela 5).

Tabela 5. Microrganismos isolados a partir das amostras de leite positivas às provas de Whiteside e California Mastitis Test

Microrganismos	Nº de amostras	Frequência
<i>Staphylococcus aureus</i>	08	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20	50
<i>Micrococcus</i> sp	02	05
<i>Escherichia coli</i>	05	12,5
<i>Streptococcus</i> β hemolítico	01	2,5
<i>Alcaligenes</i> sp. <i>difteroides</i>	01	2,5

O menor percentual de amostras positivas detectadas pela prova de Whiteside em comparação ao CMT indica menor sensibilidade do primeiro teste na identificação da mastite subclínica em seus estágios iniciais e no grau de infecção, visto que não foi possível diferenciar a formação de grumos da massa gelatinosa e viscosa. Entre as 104 amostras positivas pelo CMT, 78 também foram positivas para o teste de Whiteside.

Brito et al. (1997) consideram o uso regular do CMT como importante ferramenta para melhoria do estado sanitário do rebanho, se usado para orientar a adoção de medidas

para o controle da mastite, ou associado a práticas adequadas de manejo e higiene. Segundo Sargeant et al. (2001) e Dingwell et al. (2003), o CMT pode ter um papel útil no controle efetivo em programas leiteiros, como teste de triagem para detecção de vacas com mastite subclínica.

Em estudo realizado em fazendas leiteiras do Rio Grande do Sul, Ribeiro et al. (2003) correlacionaram amostras de leite oriundas de vacas com mastite clínica, subclínica infecciosa e não-infecciosa, diretamente e indiretamente pelo CMT e exame microbiológico. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa quanto à

identificação da mastite subclínica pelo CMT, sugere-se maior cautela se utilizada como indicativo de infecção intramamária, devido à ausência de crescimento bacteriológico em grande número de amostras.

Verificou-se que, em 10 ou 5,12%, das amostras positivas às provas de Whiteside e Califórnia Mastitis Test, houve crescimento bacteriano (Tabela 6). Dos agentes patogênicos, o *Staphylococcus epidermidis* (50%) e *Staphylococcus aureus* (20%) foram os de maior prevalência. Estas bactérias, segundo Brito et al. (1999) e Barbalho & Mota (2001), são as principais causadoras da mastite em vacas leiteiras. A proliferação destes microrganismos advém das precárias condições de manejo sanitário das instalações e dos procedimentos de ordenha inadequados, ou seja, pouco higiênicos.

O *Staphylococcus* ssp foi descrito em diversas pesquisas como a principal bactéria isolada em exames microbiológicos (PARDO et al., 1998; BRITO et al., 1999; BARBALHO & MOTA, 2001; ZAFALON et al., 2005). Neste estudo, a predominância do *S. epidermidis* no exame microbiológico demonstrou que esse agente é o mais freqüentemente isolado nas infecções da glândula mamária, ressaltando, dessa forma, sua importância epidemiológica.

A importância do exame microbiológico em amostra de animais negativos ao CMT foi ressaltada por Brito et al. (1999), cujos resultados foram positivos, principalmente para os gêneros *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

O *S. aureus* é um agente patogênico bastante comum e também responsável por surtos de intoxicação alimentar. Suas peculiaridades quanto ao seu habitat tornam-no largamente distribuído na natureza e facilmente transmissível aos alimentos por manipuladores – na maioria, portadores assintomáticos – e pelos animais, principalmente vacas leiteiras com mastite (STAMFORD et al., 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento representa, além de perdas econômicas, um grande risco para a saúde pública. A enterotoxina A é constante na maioria dos casos de toxinfecções alimentares causadas por *Staphylococcus aureus*. Essa síndrome é determinada mais freqüentemente pela toxina do choque tóxico, porém as enterotoxinas dos tipos B e C também podem ser implicadas por sua presença em amostras de leite de animais com mastite subclínica (SÁ et al., 2004; STAMFORD et al., 2006).

Amostras de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* têm sido isoladas de leite em pó, cru e pasteurizado, iogurte caseiro, achocolatados e sorvetes, bem como de outros subprodutos lácteos. A fonte de contaminação pode ser tanto do leite proveniente de vacas com mastite, como dos manipuladores envolvidos (OMBUI et al., 1992; SÁ et al., 2004; STAMFORD et al., 2006).

No estado de Pernambuco, constatou-se a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* com capacidade para produção de enterotoxinas em leite produzido e/ou comercializado (STAMFORD et al., 2006). No entanto, o leite proveniente dos quartos mamários infectados por *S. aureus* toxigênicos não apresentou aumento significativo quanto à contagem de células somáticas (SÁ et al., 2004).

O *S. aureus*, do ponto de vista da saúde pública, destaca-se como o agente mais importante, de maior ocorrência nos rebanhos mundiais e de tratamento mais difícil, em razão da elevada resistência aos antibióticos. A produção de enterotoxinas por esses microrganismos ocorre entre 10 e 46°C e sua elevada resistência térmica favorece sua sobrevivência no leite submetido a tratamentos térmicos, como a pasteurização (OMBUI et al., 1992; FAGUNDES & OLIVEIRA 2004; SÁ et al., 2004).

Os resultados obtidos nesta pesquisa são bastante semelhantes aos descritos na literatura consultada, mesmo quando realizado em espécies diferentes. Ressalta-se a importância dos agentes isolados nesses estudos estarem envolvidos na transmissão da doença para o homem.

Portanto, são indispensáveis os cuidados preventivos relacionados à transmissão desses agentes patogênicos pela ingestão do leite e seus derivados contaminados. Os animais cujos testes de Whiteside e CMT foram positivos não apresentaram sinais de processo infeccioso da glândula mamária, porém 5,2% das amostras de leite apresentaram crescimento microbiológico. Desta forma, as condições higiênicas são fundamentais como fator predisponente para a infecção da glândula mamária sem manifestação clínica, uma vez que a disseminação do agente e a contaminação do leite são favorecidas.

O teste de CMT mostrou-se mais sensível e economicamente mais viável na identificação da mastite subclínica como método de diagnóstico de campo, quando comparado à prova de Whiteside.

REFERENCIAS

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.2, p.31-36, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial**, Brasília, p.14, 18 set. 2003. Seção 1.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S.; BRITO, M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do "Califórnia Mastite Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação a contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.49-53, 1997.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.2, p.129-135, 1999.

DINGWELL, R.T.; LESLIE, K.E.; SCHUKKEN, Y.H.; SARGEANT, J.M.; TIMMS, L.L. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.413-416, 2003.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intra-mamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.3, n.4, p.1315-1320, 2004.

MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C. **Noções de probabilidade e estatística**. 3.ed. São Paulo: IME-USP, 2001. 392p.

OMBUI, J.N.; ARIMI, S.M.; KAYHURA, M. Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. **East African Medicine Journal**, v.69, p.123-125, 1992.

PARDO, P.E.; METTIFOGO, E.; MÜLLER, E.E.; NASCIMENTO, E.R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; FREITAS, J. C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3-4, p.115-118, 1998.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JÚNIOR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

ROSEMBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1993. p.306.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v.41, n.5, 2004.

SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY, J.E.; PULKRABEK, B.J.; LIM, G.H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.9, p.2018-2024, 2001.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, B. Experimental and observation leading to development of the California Mastitis test. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole Ltda, 2006. p.1019-1022.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Comparação entre o California Mastitis Test e a contagem de células somáticas como métodos auxiliares para o diagnóstico da mastite subclínica bovina por *S. aureus* e *Corynebacterium spp.* **Boletim da Indústria Animal**, v.62, n.1, p.63-69, 2005.

Data de recebimento: 21/02/2008

Data de aprovação: 12/11/2008