

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DE INDICADORES INFLAMATÓRIOS NO
DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA

A.M.M.P. Della Libera, F.N. Souza, M.G. Blagitz, C.F. Batista

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: dellalibera@usp.br.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite em bovinos. Desta forma, a contagem de células somáticas (CCS) o California Mastitis Test (CMT), a concentração hidrogeniônica (pH), a condutividade elétrica (CE), e o conteúdo de cloretos de 321 amostras de leite provenientes de quartos mamários negativos à prova de fundo escuro e sem nenhuma alteração clínica evidente foram analisadas. Os valores preditivos foram calculados pela sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de probabilidades utilizando diferentes valores de corte, e considerando o exame bacteriológico como “padrão ouro”. O exame bacteriológico resultou em 46,73% das amostras positivas, sendo o *Staphylococcus* sp. o principal gênero isolado. A CCS e o CMT apresentaram-se como os melhores testes para o diagnóstico indireto da mastite. No entanto, o pH, a condutividade elétrica e o conteúdo de cloretos não se mostraram como métodos diagnóstico seguros quando utilizados isoladamente.

PALAVRAS-CHAVE: Contagem de células somáticas, infecção intramamária, leite.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE INDICATORS OF INFLAMMATION IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE MASTITIS. The aim of this trial was to evaluate and compare the distinct indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. The somatic cell count (SCC), the California Mastitis Test score, the electrical conductivity, the hydrogen ion concentration (pH), the chloride content and the bacteriological status of 321 milk samples from mammary glands without any clinical signs were analyzed. Their predictor value as an indicator of inflammation was calculated considering the bacteriologic examination as the gold standard test. Then, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and likelihood ratio at various cut-off values were established. The bacteriologic exam resulted in 46.73% of the samples being positive, with *Staphylococcus* sp. the main genus isolated. The SCC and CMT proved to be the best predictors. On the other hand, pH, electrical conductivity and chloride content did not prove to be reliable diagnostic indicators when used in isolation.

KEY WORDS: Intramammary infection, milk, somatic cell count.

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária usualmente causado por bactérias, sendo a doença de maior impacto econômico na pecuária leiteira mundial. Além disso, é a principal causa de descarte de animais, e a prevenção e o tratamento desta enfermidade são responsáveis pela maior porcentagem do uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (RUEGG; REINEMANN, 2002; MAKOVEC; RUEGG, 2003).

A detecção definitiva da mastite é baseada no isolamento de patógenos por meio da coleta asséptica das amostras de leite (McDOUGALL *et al.*, 2001). No entanto, o exame bacteriológico apresenta limitações devido à exigência de exames laboratoriais, tempo requerido para a cultura e custos. Adicionalmente

a isso, os testes bacteriológicos nem sempre são confiáveis (McDOUGALL *et al.*, 2001; PYÖRÄLÄ, 2003), sendo reportado que o isolamento bacteriano pode não ser identificado em mais de 20% das amostras (MAKOVEC; RUEGG, 2003; TAPONEN *et al.*, 2009).

A mastite também ocasiona mudanças na composição láctea, sendo sua extensão dependente da resposta inflamatória. Alguns componentes são mais marcantes que outros podendo ser utilizados como ferramenta para a detecção do processo inflamatório (PYÖRÄLÄ, 2003). Sabendo que essas alterações ocorrem durante o processo inflamatório, testes indiretos como a contagem de células somáticas (CCS), o California Mastitis Test (CMT), a concentração hidrogeniônica (pH), a condutividade elétrica, o con-

teúdo de cloreto e lactose podem ser utilizados para diagnóstico dessa enfermidade (RUEGG; REINEMANN, 2002). A precisão dos testes diagnósticos pode ser mensurada pela sensibilidade (SE), que é a proporção de animais doentes que são corretamente classificados como doentes, e pela especificidade (ES), que é denominada como a porcentagem de animais sadios que são devidamente enquadrados como sadios. Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) são definidos como a probabilidade que um animal sadio ou doente apresenta de ser corretamente classificado, considerando a prevalência da doença na população estudada. Já a razão de probabilidades (RP) é definida pelo aumento na probabilidade de um valor positivo seja um verdadeiro resultado positivo comparado com um animal não examinado (McDOUGALL *et al.*, 2001).

Neste trabalho objetivou-se, por meio das alterações do leite e na glândula mamária, avaliar o desempenho de diferentes testes na predição da presença bacteriana em amostras lácteas, com o intuito de se estabelecer meios diagnósticos auxiliares na identificação da mastite infecciosa.

Foram coletadas 321 amostras lácteas, provenientes de quartos mamários negativos à prova de fundo escuro e sem nenhuma alteração clínica evidente, que foram submetidas à determinação da concentração hidrogeniônica, condutividade elétrica, CCS, CMT e exame microbiológico.

No exame bacteriológico, 10 µL das amostras de leite foram semeados em placa de Petri contendo ágar-sangue de carneiro desfibrinado (5%) e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. A identificação bacteriana foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo National Mastitis Council em 1999.

A determinação da concentração hidrogeniônica foi realizada em pH-metro modelo B474 da Micronal® (Celm®, Barueri, Brasil). A mensuração da concentração de cloreto (925 Chloride Analyzer, Corning®, Nova Iorque, EUA) e a condutividade elétrica (CE) (Milk Checker®, Tóquio, Japão) foram realizadas em aparelhos utilizados para tal finalidade. A CCS foi realizada pela microscopia através de esfregaços corados com hematoxilina-eosina (BENITES *et al.*, 2001), onde foram contados 100 campos, sendo ainda diferenciadas as populações de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares por suas características morfotintórias. O CMT foi realizado conforme descrito por McDOUGALL *et al.* (2001), sendo agrupado em negativo (0) e positivo, este último subdividido em 1+, 2+ e 3+.

Os dados foram analisados utilizando programa estatístico GraphPad InStat Software (GraphPad Software, Inc., EUA). Os dados da CCS foram transformados em escala logarítmica, pois não apresentaram distribuição normal. O efeito da presença bacteriana sob a CCS, o CMT, a pH, a condutividade

elétrica, o conteúdo de cloretos foram avaliados utilizando o One-Way Analysis of Variance (ANOVA) para comparação entre as médias, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. A correlação entre as variáveis quantitativas CCS e o CMT foi determinada pela correlação linear de Pearson (r). O valor de $P \geq 0,05$ foi considerado significativo (SAMPAIO, 2002).

As predições dos testes diagnósticos foram avaliadas pelo teste exato de Fisher através da SE, ES, VPP, VPN e RP considerando o exame bacteriológico como padrão ouro. Nestes casos, foram utilizados os valores de corte para SE, SP, VPP, VPN e RP na CCS de 5,00; 5,30 e 5,60 por estarem dentro dos parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa 51 e sugeridos por RUEGG; REINEMANN (2002); no CMT empregou-se valores de 0 (zero) e 1 (um); na CE estabeleceu-se os valores de 4,0; 5,5 e 6,75 como proposto por RUEGG; REINEMANN (2002) e BRUCKMAIER *et al.* (2004), no pH utilizou-se os valores de 6,63; 6,69 e 6,81, e na concentração de cloretos os valores de 100,5; 142,7 e 183,5 mg/100 mL como sugerido por OGALA *et al.* (2007) em animais com alta e baixa contagem de células somáticas.

Na prova bacteriológica foram observadas 46,73% das amostras positivas. Destas, 64,00% foram isolados *Staphylococcus* sp., 19,33% *Streptococcus* sp., 10,67% *Corynebacterium* sp., 2,67% *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* sp., 2,00% *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* sp. e 1,33% *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. Desta forma, o presente estudo corrobora com os dados descritos por MAKOVEC; RUEGG (2003), BARKEMA *et al.* (2006) e MACHADO *et al.* (2008), onde se ressaltou a importância destes gêneros bacterianos na etiologia da mastite bovina.

Na CCS foram encontrados valores logarítmicos de 4,70 ($\pm 0,71$) e 5,48 ($\pm 0,75$) células/mL para os animais negativos e positivos ($P < 0,0001$), respectivamente. Sabe-se que as glândulas mamárias sadias de bovinos geralmente apresentam valores logarítmicos da CCS menores que 5,30 células/mL, sendo que a maioria das mamas híidas mantém valores logarítmicos da CCS inferiores a 5,0 células/mL (RUEGG; REINEMANN, 2002). Na proporção das populações de leucócitos no leite, dado pela proporção de polimorfonucleares sobre a de mononucleares, observou-se os valores médios de 1,72 ($\pm 2,53$) e 3,72 ($\pm 4,67$) nos animais negativos e positivos no exame bacteriológico ($P < 0,0001$), respectivamente. No CMT, obteve-se os valores médios de 0,22 ($\pm 0,63$) para os animais negativos e 0,91 ($\pm 1,01$) para os positivos ($P < 0,0001$). Na concentração hidrogeniônica foram observados valores de 6,57 ($\pm 0,17$) e 6,63 ($\pm 0,18$) para os animais negativos e positivos ($P = 0,0055$), respectivamente. Valores semelhantes foram descritos por DELLA LIBERA *et al.* (2001) em animais com baixa ($\leq 5 \times 10^5$ células/mL) e alta celularidade (< 5

$\times 10^5$ células/mL). No teor de cloretos encontrou-se 104,70 ($\pm 25,58$) e 109,90 ($\pm 30,98$) mg/100 mL para os animais negativos e positivos ($P = 0,1017$), respectivamente. Valores similares do teor de cloretos foram descritos por OGALA *et al.* (2007) em animais com baixa ($< 2,5 \times 10^5$ células/mL) e alta celularidade ($< 2,5 \times 10^5$ células/mL) no leite. Na CE observou-se valores de 4,51 ($\pm 0,69$) para os animais negativos e 4,60 ($\pm 0,74$) mS/cm para os negativos ($P = 0,249$). Similarmente, DELLA LIBERA *et al.* (2001) encontraram valores semelhantes em animais com baixa ($\leq 5 \times 10^5$ células/mL) e alta celularidade ($< 5 \times 10^5$ células/mL). Os valores preditivos dos distintos marcadores inflamatórios ao utilizar os diferentes valores de corte estão apresentados na Tabela 1.

A CCS é um marcador inflamatório da glândula mamária amplamente utilizada no diagnóstico da mastite (RUEGG; REINEMANN, 2002). O isolamento bacteriano foi associado com aumento significativo na CCS, principalmente decorrente do aumento de polimorfonucleares, apresentando como o melhor preditor para a determinação da presença bacteriana. O escore de CMT foi positivamente correlacionado com a CCS ($r = 0,73$; $P < 0,0001$) e presença bacteriana ($P < 0,0001$). Assim, a CCS e o CMT apresentaram-se como testes confiáveis na identificação da mastite infecciosa, como já foram demonstrados por outros autores (RUEGG; REINEMANN, 2002; PYORALLA, 2003).

O aumento do pH durante a mastite está associado com o aumento da permeabilidade da glândula mamária aos componentes sanguíneos, o que faz com que ocorra a migração de componentes alcalinos do sangue, principalmente o íon bicarbonato. O aumento significativo na concentração hidrogeniônica foi encontrado, como demonstrado por OGALA *et al.* (2007), em animais com baixa e alta CCS, porém os valores

preditivos encontrados foram apenas razoáveis ao confrontar com a CCS.

Os íons cloreto e os íons sódio estão presentes na circulação sanguínea e durante a mastite atravessam os capilares sanguíneos, direcionando-se ao lúmen dos alvéolos da glândula mamária. Tal processo ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e à destruição das junções celulares e do sistema de bombeamento iônico causados pelo processo inflamatório (ZAFALON *et al.*, 2005). Vários autores, ao avaliarem a condutividade elétrica do leite, que é determinada pela concentração iônica e a concentração de cloretos, relataram baixa predição destes testes na detecção de mastite infecciosa, como encontrado no presente estudo, sendo ainda sugerida a análise entre as metades com o intuito de se melhorar a predição do teste (RUEGG; REINEMANN, 2002). Foi também relatado que estes parâmetros apenas podem ser utilizados no diagnóstico desta enfermidade no leite proveniente da cisterna do teto anterior a ejeção do leite pelos alvéolos (BRUCKMAIER *et al.*, 2004).

Todavia, esses parâmetros podem ser influenciados por fatores como idade, estágio lactacional, produção, estação do ano, fração láctea coletada, variações entre animais e patogenicidade do agente, podendo refletir na avaliação dos testes analisados. Ainda, grande parte da predição dos testes diagnósticos é baseada no exame bacteriológico como padrão ouro, no entanto a mastite nem sempre requer a presença bacteriana ou se consegue sucesso no isolamento bacteriano (PYÖRALÄ, 2003; ZAFALON *et al.*, 2005).

Desta forma, pode-se concluir que a CCS e o CMT apresentaram-se como ferramentas confiáveis para o diagnóstico da mastite, não podendo o mesmo ser aplicado para os demais testes.

Tabela 1 - Valores preditivos dos testes diagnósticos.

Variável	Valores de corte	SE	SP	VPP	VPN	RP
CCS	5,00*	0,831	0,739	0,757	0,817	3,183
	5,30*	0,674	0,774	0,858	0,540	2,979
	5,60*	0,622	0,787	0,905	0,388	2,915
CMT	0,00*	0,888	0,470	0,652	0,789	1,675
	1,00*	0,935	0,227	0,577	0,756	1,209
pH	6,63*	0,805	0,384	0,594	0,637	1,307
	6,50*	0,894	0,238	0,568	0,667	1,173
	6,69	0,970	0,053	0,534	0,615	1,025
Cloreto (mg/100 mL)	110,05	0,610	0,497	0,575	0,532	1,211
	142,70*	0,976	0,106	0,550	0,800	1,092
	183,50*	0,994	0,053	0,540	0,889	1,050
Condutividade elétrica (mS/cm)	4,00	0,503	0,567	0,567	0,503	1,161
	5,50	0,982	0,060	0,538	0,75	1,044
	6,75	0,994	0,020	0,532	0,75	1,014

*: $P \leq 0,05$. CCS: contagem de células somáticas, CMT: California Mastitis Test, pH: concentração hidrogeniônica, Cloreto: concentração de cloretos, Se: sensibilidade, SP: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RP: razão de probabilidades.

REFERÊNCIAS

- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1877-1895, 2006.
- BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; COSTA, E.O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. *Napgama*, v.4, n.3, p.6-9, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o... *Diário Oficial da União*, Brasília, 21 set. 2002. Seção I, p.13.
- BRUCKMAIER, R.M.; WEISS, D.; WIEDERMANN, M.; SCHMITZ, S.; WENDL, G. Changes of physicochemical indicators during mastitis and effects of milk ejection on their sensitivity. *Journal of Dairy Research*, v.71, p.316-321, 2004.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; COSTA, E.O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.F.P.; BENATTI, L.A.T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.1, n.2, p.42-47, 2001.
- MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.278-282, 2008.
- MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2000. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.3466-3472, 2003.
- MCDUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, v.40, p.245-254, 2001.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. (US). *Laboratory handbook on bovine mastitis*. Arlington, VA: WD Hoard & Sons, 1999. 222p.
- OGALA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effects of mastitis on raw milk composition quality. *Journal of Veterinary Science*, v.8, n.3, p.237-242, 2007.
- PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, v.34, p.565-578, 2003.
- RUEGG, P.L.; REINEMANN, D.J. Milk quality and mastitis test. *Bovine Practice*, v.36, p.41-54, 2002.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M.T.; PYORALLA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culture. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.2610-2617, 2009.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos como métodos auxiliares de diagnóstico da mastite subclínica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.3, p.150-163, 2005.

Recebido em 24/11/09

Aceito em 19/4/11