

(INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA MEDIANTE INOCULAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE *Staphylococcus aureus* (ESTIRPE ATCC 25923))

(EXPERIMENTAL SUBCLINICAL MASTITIS IN HOLSTEIN COWS BY INTRAMAMMARY INOCULATION OF *Staphylococcus aureus* (STRAIN ATCC 25923))

(INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS DE LA RAZA HOLSTEIN POR MEDIO DE LA INOCULACIÓN INTRAMAMARIA DE *Staphylococcus aureus* (ESTIRPE ATCC 25923))

L. P. MARTINS FILHO¹, A. M. C. VIDAL-MARTINS²,
F. T. R. S. CESCO³, P. B. SICCHIEROLLI³, P. C. MELO³, J. J. FAGLIARI⁴

RESUMO

A bactéria *Staphylococcus aureus* é a principal causadora de infecção intramamária em vacas e representa importante problema de saúde pública e de produtividade de leite em vários países, sendo o microorganismo mais frequentemente isolado em amostras de leite de glândulas infectadas, no Brasil. O objetivo desse estudo foi verificar a viabilidade do modelo experimental de indução de mastite subclínica bovina mediante inoculação intramamária de *S. aureus* e avaliar as conseqüências clínicas e laboratoriais relacionadas à infecção. Foram examinados 40 quartos mamários de 12 vacas da raça Holandesa sadias, submetidos a dois procedimentos: Grupo 1: 10 quartos mamários não inoculados com *S. aureus*; e Grupo 2: 30 quartos mamários inoculados com 500 UFC de *S. aureus* (estirpe ATCC 25923). Esse método de indução foi efetivo em 63,3% dos quartos mamários inoculados com a bactéria. A contagem de células somáticas foi significativamente maior nas amostras oriundas de quartos mamários inoculados, coletadas 72 horas após a infusão das bactérias ($2.432,20 \times 10^3$ células/mL), indicando agravamento da resposta inflamatória do tecido glandular, em relação aos quartos não inoculados. A concentração de proteína total do soro lácteo não foi influenciada pela reação inflamatória induzida ao tecido mamário pela cepa de *S. aureus* utilizada, notando-se valores que variam de $4,26 \pm 0,61$ a $4,38 \pm 0,40$ g/dL, no grupo 1, e de $4,28 \pm 0,43$ a $4,47 \pm 1,00$ g/dL, no grupo 2.

PALAVRAS-CHAVE: Mastite subclínica. Vacas. *Staphylococcus aureus*. Infecção experimental.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is the major bacteria involved in cow intramammary infections and it represents an important concern to public health and to the milk production over the world. *S. aureus* is the most prevalent organism isolated in milk samples from infected mammary glands, in Brazil. The goal of this study was to verify the viability of the experimental model of bovine subclinical mastitis induced by *S. aureus* inoculation and to evaluate the clinical and laboratory

1 Docente do Departamento de Clínica Médica e Cirurgia de Grandes Animais - UNIRP - São José do Rio Preto - SP

2 Docente da UNIRP - São José do Rio Preto - SP

3 Médico Veterinário Autônomo.

4 Docente do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV-Unesp- Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5 - 14.884-900, Jaboticabal-SP. E-mail: fagliari@fcav.unesp.br

results related to the infection. It were examined 40 mammary quarters from 12 health Holstein cows, submitted to two procedures: Group 1: ten not inoculated mammary quarters; and Group 2: thirty mammary quarters inoculated with 500 CFU of *S. aureus* (strain ATCC 25923). This method induced subclinical mastitis in 63.3% of the inoculated mammary quarters. Total cell count was significantly higher in milk samples from group 2 obtained 72 hours after bacteria inoculation ($2,432.20 \times 10^3$ cells/mL), showing tissue inflammatory response, in comparison with not inoculated quarters. Milk total protein concentrations were not influenced by inflammatory response induced by *S. aureus* and the values ranging from 4.26 ± 0.61 to 4.38 ± 0.40 g/dL, in group 1, and from 4.28 ± 0.43 to 4.47 ± 1.00 g/dL, in group 2.

KEY-WORDS: Subclinical mastitis. Cows. *Staphylococcus aureus*. Experimental infection.

RESUMEN

La bacteria *Staphylococcus aureus* es la causa principal de infección intramamaria en vacas y representa un importante problema de salud pública y de productividad de leche en varios países. Este microorganismo es el más frecuentemente aislado en muestras de leche de glándulas infectadas en el Brasil. El objetivo de este estudio fue verificar la viabilidad del modelo experimental de inducción de mastitis subclínica bovina por medio de la inoculación intramamaria de *S. aureus* y evaluar las consecuencias clínicas y laboratoriales relacionadas a la infección. Fueron examinados 40 cuartos mamarios de 12 vacas saludables de la raza Holstein, sometidas a dos procedimientos: Grupo 1: 10 cuartos mamarios no inoculados con *S. aureus*; y Grupo 2: 30 cuartos mamarios inoculados con 500 UFC de *S. aureus* (estirpe ATCC 25923). Ese método de inducción fue efectivo en 63,3% de los cuartos mamarios inoculados con la bacteria. El recuento de células somáticas fue significativamente mayor en las muestras provenientes de los cuartos mamarios inoculados, colectadas 72 horas después de la infusión de las bacterias ($2.432,20 \times 10^3$ células/ml), indicando agravamiento de la respuesta inflamatoria del tejido glandular, en relación a los cuartos no inoculados. La concentración de proteína total del suero lácteo no fue influenciada por la reacción inflamatoria inducida en el tejido mamario por la cepa de *S. aureus* usada, notándose valores que variaron de $4,26 \pm 0,61$ a $4,38 \pm 0,40$ g/dl en el grupo 1 y de $4,28 \pm 0,43$ a $4,47 \pm 1,00$ g/dl, en el grupo 2.

PALABRAS-CLAVE: Mastitis subclínica. Vacas. *Staphylococcus aureus*. Infección experimental.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina corresponde à inflamação da glândula mamária que assume relevância econômica devido ao aumento dos custos de substituição, à perda do potencial genético do rebanho e ao importante prejuízo decorrente da redução da quantidade e da qualidade do leite, inclusive com risco à saúde pública em razão da possível transferência de microorganismos patogênicos ao homem (LARANJA et al., 1999). A mastite pode se manifestar de várias formas. Na forma subclínica, ao contrário da infecção clínica, não ocorrem alterações macroscópicas na aparência do leite ou do úbere, embora ocorram modificações na produção e na composição do leite (BRITO et al., 1997). Apesar do relativo sucesso na redução da prevalência de infecções intramamárias, a mastite causada por *Escherichia coli*, por estreptococos ambientais e por *Staphylococcus aureus* ainda representa importante problema aos produtores de leite em várias partes do mundo. No Brasil, o *S. aureus* é uma das bactérias com maior frequência de isolamento nas amostras de leite de glândulas infectadas; provavelmente, é o mais importante patógeno da glândula mamária (COSTA et al., 2001, DELLA LIBERA et al., 2001).

A bactéria *S. aureus* é dotada de vários fatores de virulência que permitem a ela superar as defesas específicas e inespecíficas da glândula mamária (THIERS et al., 2000). A infecção mamária por *S. aureus* parece comportar-se como doença contagiosa, indicando que a transmissão entre os animais significa um importante papel na dinâmica da enfermidade e apenas uma parte dos animais permanece infectada após a infecção experimental (GARBARINO et al., 2002). Segundo esses autores, há variação individual em relação à capacidade de eliminação do *S. aureus* da glândula mamária e, portanto, a avaliação dos fatores individuais das vacas que atuam na rápida eliminação da infecção é imprescindível para o entendimento da dinâmica da infecção intramamária por *S. aureus*.

O objetivo do presente estudo foi verificar a viabilidade do modelo experimental de indução de mastite bovina com *S. aureus* e avaliar as consequências clínicas e laboratoriais relacionadas à infecção, de modo a se obter subsídios para melhor entendimento da fisiopatogenia da infecção mamária causada pela bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 40 cuartos mamários de 12

vacas da raça Holandesa branca e preta sadias entre o segundo e o sétimo mês de lactação, com 2 a 5 anos de idade, com glândula mamária funcional e sem indicio clínico de infecções anteriores (ROSENBERGER, 1993). A secreção desses quartos mamários apresentava menos de 350.000 células somáticas/mL e era negativa ao exame microbiológico (POSTLE et al., 1978). A partir daí foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 10 quartos mamários que receberam infusão intramamária de 5,0 mL de água destilada estéril; e Grupo 2: 30 quartos mamários submetidos à infusão intramamária de, aproximadamente, 500 UFC de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923) suspensas em 5,0 mL de água destilada estéril.

Para a preparação do inóculo foi obtida uma estirpe liofilizada de *S. aureus* (ATCC 25923) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a qual foi inoculada em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) e incubada a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, 1 mL deste inóculo foi transferido para um tubo de ensaio com 9 mL de água peptonada a 0,1% (10^{-1}) e assim sucessivamente até a diluição 10^{-13} . Após a realização das diluições, 0,1 mL de cada diluição foi transferido para placas de petri contendo ágar-sangue a 5%, em duplicata, para a contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (POSTLE et al., 1978). Ao final, 0,1 mL de inóculo continha, aproximadamente, 500 unidades formadoras de colônia (UFC), o qual foi acrescido de 5,0 mL de água destilada estéril para facilitar a inoculação intramamária.

A partir da inoculação de água peptonada a 0,1% ou de *S. aureus* os animais foram submetidos ao exame clínico específico da glândula mamária de acordo com as recomendações de Rosenberger (1993) e ao California Mastitis Test (CMT) do leite em 4 momentos, antes da inoculação (M1) e 24 horas (M2), 48 horas (M3) e 72 horas (M4) após a inoculação. Nos mesmos momentos foram coletados 10 mL de leite para a determinação da concentração de proteína total do soro lácteo por refratometria, de acordo com a técnica descrita por Sant'Ana e Birgel (2003).

Para a análise microbiológica do leite e contagem de células somáticas (CCS) foram obtidos assepticamente (VEISSEYRE 1972), 20 mL de leite de cada quarto, em dois momentos, sendo um imediatamente antes da inoculação intramamária de *S. aureus* (M_1) e outro 72 horas após a inoculação (M_2). Após o acondicionamento em caixas de material isotérmico, contendo gelo reciclável, as amostras foram transportadas para o Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal/Unesp. Após o cultivo em placa de ágar-sangue a 5% por 24 a 48 horas, as colônias suspeitas foram isoladas e identificadas de acordo com as recomendações de Kloos e Lambe (1991) e Varnam e Evans (1991), utilizando-se coloração de Gram,

atividade da coagulase, produção de pigmento, hemólise, prova da catalase, fermentação da glicose e manitol em aerobiose e anaerobiose e produção de acetoina pela prova de Voges-Proskauer (MacFADIN, 1976). A CCS da secreção mamária foi realizada através do método descrito por Jain (1986). Para tal, os esfregaços foram corados pelo método de BRODHURST-PALEY modificado, indicado por Santos e Vilela (1983). A leitura das lâminas foi realizada contando-se 100 campos microscópicos, segundo recomendação do Sub-Committee on Screening Tests do National Mastitis Council (1987) e o International Dairy Federation (IDF/FIL) (1981). O resultado final foi multiplicado pelo fator de trabalho do microscópio utilizado (3.929,8) (IDF/FIL, 1981).

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador *Statistical Analysis System-SAS* (1995). Ao se constatar significância entre grupos e momentos foi aplicado o teste de Tukey ($P < 0,05$), para a comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto os quartos mamários não inoculados quanto os inoculados com *S. aureus* não apresentaram alteração no parênquima indicativa de mastite clínica, ao longo do período experimental. Também não foram notadas quaisquer alterações de cor, odor e presença de grumos ou flocos na secreção mamária. Os resultados dos exames microbiológicos, da contagem de células somáticas, da reação ao California Mastitis Test (CMT) e da concentração de proteína total do soro lácteo da secreção de quartos mamários não inoculados (G1) e de quartos mamários inoculados com *S. aureus* (G2), estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Os resultados dos exames microbiológicos da secreção dos quartos mamários, apresentados na Tabela 1, indicam que todos os quartos do G1 mantiveram-se negativos ao longo da fase experimental e que 19 dos 30 quartos do G2 apresentaram-se positivos 72 horas após a inoculação intramamária de 500 UFC de *S. aureus* (ATCC 25923), indicando que o método de indução de mastite subclínica foi efetivo em 63,3% dos quartos mamários inoculados com a bactéria, resultado semelhante aos descritos por Postle et al. (1978). Schukken et al. (1999) obteve sucesso em 51,3% das inoculações com *S. aureus* (Newbould 305).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das contagens de células somáticas. Nota-se, com evidência, CCS significativamente maior nas amostras oriundas de quartos mamários inoculados, coletadas 72 horas após a infusão das bactérias ($2.432,20 \times 10^3$ CCS/mL), indicando agravamento da resposta inflamatória do tecido glandular, em relação aos quartos não inoculados do G1, à semelhança do relato de Gudding et al. (1984). A variação individual na CCS após a inoculação de *S. aureus* possivelmente se

deve à ação distinta dos mecanismos de defesa da glândula mamária frente à bactéria.

Os resultados do California Mastitis Test (CMT), apresentados na tabela 3, mostram que embora às 24 horas após a inoculação a maioria dos quartos induzidos apresentassem positividade ao teste (reação +), foi às 72 horas depois da aplicação do inóculo que se constataram as reações positivas mais intensas, indicando a evolução da resposta inflamatória. Tal cinética da inflamação foi confirmada pelo aumento da contagem de células somáticas (Tabela 2).

A concentração de proteína total do soro

lático (Tabela 4) não foi influenciada pela reação inflamatória induzida ao tecido mamário pela cepa de *S. aureus* utilizada, notando-se valores médios que variam de 4,26±0,61 a 4,38±0,40 g/dL, no grupo 1, e de 4,28±0,43 a 4,47±1,00 g/dL, no grupo 2. É provável que o fracionamento eletroforético dessas proteínas seja a técnica mais adequada para avaliar as alterações nas concentrações protéicas que ocorrem no leite de quartos mamários infectados, pois por meio dela é possível detectar os teores de proteínas de fase aguda da resposta inflamatória, tanto no leite quanto no soro sanguíneo (Fagliari et al., 2003).

Tabela 1 - Resultados dos exames microbiológicos da secreção de quartos mamários não inoculados (G1) e de quartos mamários inoculados com *S. aureus* (estirpe ATCC 25923) (G2), antes (M1) e 72 horas após a inoculação (M2).

Grupos	Momentos			
	M 1		M 2	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
G 1	0	10	0	10
G 2	0	30	19 (63,3%)	11 (36,7%)

Tabela 2 - Contagem de células somáticas ($\times 10^3/\text{mL}$) da secreção de quartos mamários não inoculados (G1) e de quartos mamários inoculados com *S. aureus* (estirpe ATCC 25923) (G2), antes (M1) e 72 horas após a inoculação (M2).

Grupos		Momentos	
		M 1	M 2
G 1	Média	68,44a	117,52b
	LI	3,93	3,93
	LS	220,07	466,66
G 2	Média	87,27a	2.432,20b
	LI	0,98	18,66
	LS	324,21	19.739,39

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre momentos (M) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

LI: Limite inferior; LS: Limite superior.

Tabela 3 - Resultados do California Mastitis Test em amostras de quartos mamários em quatro momentos - antes da inoculação intramamária de *S. aureus* (estirpe ATCC 25923) (M1) e 24 (M2), 48 (M3) e 72 horas (M4) após a inoculação.

Grupos	Quartos	Momentos			
		M 1	M 2	M 3	M 4
G1	*	-	-	-	-
	1	-	-	+	++
	2	-	+	+	+
	3	-	+	++	++
	4	-	+	++	+
	5	-	-	+	+
	6	-	-	+	+
	7	-	-	++	++
	8	-	-	++	++
	9	-	+	+	++
	10	-	+	+	++
	11	-	-	+	++
	12	-	-	+	++
	13	-	+	++	++
G2	14	-	+	+	+
	15	-	+	++	+++
	16	-	+	+	++
	17	-	+	+	++
	18	-	+	++	+
	19	-	+	++	+++
	20	-	+	+	+
	21	-	+	+	++
	22	-	+	++	++
	23	-	+	++	++
	24	-	-	++	++
	25	-	+	++	+++
	26	-	+	+	++
	27	-	-	-	+
	28	-	++	++	++
	29	-	+	+	++
	30	-	+	+	++

*: os dez quartos pertencentes ao grupo 1 permaneceram negativos durante todo período experimental.

(-) < 350x10³ cels/mL; (+) 350–800x10³ cels/mL; (++) 800-5.000x10³ cels/mL; (+++) >5.000x10³ cels/mL.

Tabela 4 - Concentração de proteína total no soro lácteo (g/dL) de amostras de quartos mamários em quatro momentos - antes da inoculação intramamária de *S. aureus* (estirpe ATCC 25923) (M1) e 24 (M2), 48 (M3) e 72 horas (M4) após a inoculação.

Grupos	Momentos			
	M 1	M 2	M 3	M 4
G1	4,33±0,40a	4,26±0,61a	4,38±0,42a	4,28±0,47a
G2	4,28±0,43a	4,27±0,61a	4,47±0,96a	4,47±1,0a

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença entre momentos (M) pelo teste de Tukey (P<0,05).

CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a inoculação intramamária de 500 UFC de *S. aureus* (ATCC 25923) induziu mastite subclínica em 63,3% dos quartos mamários inoculados, provocando alteração na reação ao CMT, aumento da contagem de células somáticas e manutenção da infecção mamária 72 horas após a inoculação do *S. aureus*, podendo ser utilizada como modelo experimental de mastite em vacas da raça Holandesa, com grau satisfatório de repetibilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

ARTIGO RECEBIDO: Agosto/2005

APROVADO: Novembro/2005

REFERÊNCIAS

- BRITO, J. R. F., CALDEIRA, G. A. V., VERNEQUE, R. S., PAIVA e BRITO, M. A. V. Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico na mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.1-6, 1997.
- COSTA, E. O., MELVILLE, P. A., GARRINO JÚNIOR, F., RIBEIRO, A. R., SILVA, J. A. B. Microorganisms isolated from mastitis: antibiotic in vitro sensitivity. **Proceedings of the 2nd Symposium on Mastitis and Milk Quality**, p.442-443, 2001.
- DELLALEBERA, A. M. M. P., ARAUJO, 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.
- FAGLIARI, J. J., WEISS, D. J., McCLENAHAN, D., EVANSON, O. A. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.383-387, 2003.
- GARBARINO, E. J., PANTOZZI, F., VIGO, G., SER-RANO, P., CORBELLINI, N. Efficacy of intramammary antibiotic therapy during lactation in quarters with chronic subclinical infections. **National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings**, p.218-219, 2002.
- GUDDING, R., McDONALD, J. S., CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: Bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.12, p.2525-2531, 1984.
- JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.
- IDF – International Dairy Federation. *Laboratory methods for use in mastitis work*. 1981. 27p.
- KLOOS, W. E., LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALLOWS, A. *Manual of clinical microbiology*. American Society Microbiology, 1991. p.34-62.
- LARANJA da FONSECA, L. F., SANTOS, M. V., PEREIRA, C. C. *Primeiro Curso de atualização on line sobre controle de mastite*. 1999. 66p.
- MacFADIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Williams & Williams, 1976. 312p.
- POSTLE, D. S., ROGUINSKY, M., POUTREL, B. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v.39, n.1, p.29-35, 1978.
- ROSENBERGER, G. *Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993, 419p.
- SANT'ANA, V. A. C., BIRGEL, E. H. Obtenção de soro lácteo para fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: **XI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA**, Salvador, 2003.
- SANTOS, E. C., VILELA, M. A. P. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério de avaliação de qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, n.6, p.907-919, 1983.
- SCHUKKEN, Y. H., LESLIE, K. E., BARNUM, D. A., MALLARD, B. A., LUMSDEN, J. H., DICK, P. C., VESSIE, G. H., KEHRLI, M. E. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. **Journal of Dairy Science**, v.82, p. 2393-2401, 1999.
- SUBCOMMITTEE ON SCREENING TESTS, NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Direct microscopic somatic cell count in milk. **Journal Milk Feed Technology**, v.31, n.1, p.350-4, 1987.
- THIERS, F. O., BENITES, N. R., COSTA, E. O. Contagem de células somáticas de leite bovino em diferentes fases de lactação. **NAPGAMA**, v.3, n.2, p.4-8, 2000.
- VARNAM, A. H., EVANS, M. G. *Foodborne pathogens: an illustrated text*. London: Mosby Year Book, 1991.
- VEISSEYRE, R. *Lactogenia técnica*, 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1972. 629p.