

ASSOCIAÇÃO DE AGENTES PATOGENICOS ISOLADOS EM ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA, COM A PRESENÇA DE MASTITE CLÍNICA OU SUBCLÍNICA, EM VACAS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO DE CERQUEIRA CÉSAR – SP

Association of pathogenic agents isolated from microbiological analysis of water with the presence of clinical or subclinical mastitis in cows of dairy farms of Cerqueira Cesar region SP

Maria Izabel Merino de Medeiros¹, Luiz Carlos de Souza²

RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, pesquisar a relação entre os microrganismos patogênicos isolados e identificados em água utilizada na ordenha, com o isolamento e identificação dos mesmos em amostras de leite, de quartos mamários apresentando mastite clínica ou subclínica nas mesmas propriedades. Foram utilizadas 16 propriedades rurais leiteiras, escolhidas aleatoriamente, na região de Cerqueira César – SP, que utilizavam ordenha mecânica. A água utilizada na ordenha foi classificada em relação à presença de coliformes totais e fecais, como dentro dos padrões ou fora dos padrões de potabilidade humana. Nos resultados obtidos, 94% das amostras foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes totais e fecais. Os microrganismos identificados foram: *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter* spp. (25%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Edwardsiella tarda* (8%) e *Klebsiella oxytoca* (8%). Em relação ao leite, foram analisadas 373 amostras provenientes de vacas em lactação, com mastite clínica (n=19; 5%) e subclínica (n=354; 95%). Os animais com mastite subclínica foram identificados pela contagem de células somáticas (CCS), utilizando-se o aparelho eletrônico (Somacount 300, Bentley), onde a média observada foi de 1.631×10^3 células/mL. Os principais microrganismos identificados foram: *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%) e *Staphylococcus* spp. (15%). Conforme os dados obtidos, os agentes coliformes encontrados na água, utilizada na ordenha, não estavam presentes nas análises das amostras de leite dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica das respectivas propriedades, demonstrando não haver associação entre a qualidade da água e a ocorrência de mastite.

Termos para indexação: Bovinos; mastite; leite; microrganismos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to research the relation between the isolated and identified pathogenic microorganisms in the water used in the milking, with the isolation and identification of the same in milk samples of teats showing clinical or subclinical mastitis. Sixteen dairy farms were randomly chosen, in Cerqueira Cesar town - SP, which used mechanical milking. Water of the farms was classified in relation to the presence of total and fecal coliforms such as in the standard or out of the standard of human potability. In the results obtained, 94% of the samples were classified as being out of the standards in relation to total and fecal coliforms. The identified microorganisms were *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter* spp. (25%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Edwardsiella tarda* (8%) and *Klebsiella oxytoca* (8%). Regarding the milk samples, 373 samples from suckling cows were analyzed, presenting clinical mastitis (n=19; 5%) and subclinical mastitis (n=354; 95%). Animals presenting subclinical mastitis were identified by somatic cell count (SCC), utilizing electronic equipment (Somacount 300 – Bentley), where the mean found was $1,631 \times 10^3$ cells/mL. The main identified microorganisms were *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%) and *Staphylococcus* spp. (15%). According to the results obtained, coliform agents found in the water used in the milking were not present in the analysis of the milk samples of quarters presenting clinical or subclinical mastitis from the respective farms, showing that there was not an association between water quality and mastitis occurrence.

Index terms: Bovine, mastitis, milk, microorganisms.

(Recebido em 12 de dezembro de 2006 e aprovado em 12 de agosto de 2008)

INTRODUÇÃO

O manejo sanitário do rebanho leiteiro é o principal fator para obtenção de um produto final com todos os requisitos de qualidade. A mastite é, sem dúvida, um dos

mais importantes problemas sanitários que afeta a produção leiteira. Determina perdas devido à redução na produção de leite, diminuição de sua qualidade, gastos com medicamentos, honorários profissionais além do descarte em muitos casos do leite e dos animais. Sua etiologia é

¹Médica Veterinária, Doutoranda, Pesquisador Científico – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/APTA Centro Leste – Avenida Bandeirantes, 2.419 – Vila Virgínia – 14030-670 – Ribeirão Preto, SP – mariaizabel@apta.sp.gov.br

²Médico Veterinário, Doutorado em Saúde Pública, Professor Adjunto – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Distrito de Rubião Júnior – Campus de Botucatu – Cx. P. 513 – 18618-000 – Botucatu, SP – souza@fmvz.unesp.br

bastante diversificada e pode apresentar-se sob as formas de mastite clínica ou subclínica, esta última de maior importância, pois pode permanecer quiescente no rebanho sem apresentar alterações macroscópicas no úbere e no leite. Sabe-se que vários fatores contribuem para a sanidade do rebanho e dentre eles a qualidade da água é fundamental, pois mesmo sendo elemento ideal para limpeza e dessedentação dos animais poderá contribuir como veículo de impurezas bem como de microrganismos patogênicos. Com base nesses aspectos, objetivou-se, neste trabalho, pesquisar a relação entre os microrganismos patogênicos isolados e identificados em água utilizada na ordenha, com o isolamento e identificação dos mesmos em amostras de leite, de quartos mamários apresentando mastite clínica ou subclínica nas mesmas propriedades.

MATERIALE MÉTODOS

Foram analisadas 16 propriedades rurais leiteiras, tecnificadas escolhidas aleatoriamente, na região de Cerqueira César – SP que utilizavam ordenha mecânica, no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2003. Foram colhidas duas amostras de água de cada uma das 16 propriedades rurais, sendo que uma amostra foi colhida diretamente da torneira que disponibiliza essa água para uso na sala de ordenha e outra na fonte de onde esta água se originava e era captada pela propriedade, totalizando assim 32 amostras. Os resultados das análises da água classificaram as propriedades em relação à presença de coliformes totais e fecais como dentro dos padrões ou fora dos padrões de potabilidade humana (menos de 2 coliformes totais /100 mL de água). A técnica utilizada para as análises da água foi a de tubos múltiplos (APHA, 1992). Os microrganismos foram identificados segundo as características morfológicas (coloração de Gram), bioquímicas e de cultivo (CARTER & COLE JÚNIOR, 1990). Em relação ao leite, foram analisadas amostras de 423 vacas em lactação, primíparas e múltiparas, em diferentes fases de lactação, mestiças e das raças Holandês, Gir, Girolando, Pardo Suíço e Jersey, com quartos positivos para mastite clínica ou subclínica, desconsiderando os quartos em tratamento e afuncionais. Os animais que se encontravam em período colostrado e em fase de secagem não foram incluídos no grupo de estudo. Os animais foram submetidos, antes da ordenha, pela manhã ou à tarde, ao exame de Tamis (“caneca de fundo negro”), para a detecção de mastite clínica (BLOOD & RADOSTITS, 1991). Os casos de mastite subclínica foram identificados pelo California Mastitis Test – CMT, segundo Schalm & Noorlander (1957) e pela contagem de células somáticas (CCS), em aparelho eletrônico (Somacount 300 – Bentley). Os microrganismos

foram identificados segundo as características de cultivo morfológicas (coloração de Gram) e bioquímicas (CARTER & COLE JÚNIOR, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se nos resultados relacionados à origem da água que das 16 fontes utilizadas, 57% advinham de minas, 31% de poços, 6% tratadas e 6% de rio (Figura 1).

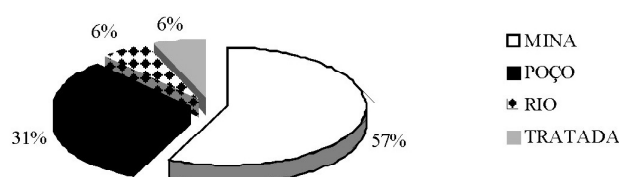


Figura 1 – Origem das amostras das fontes de água.

Após a análise das fontes de água, verificou-se que 56% das amostras estavam fora dos padrões de potabilidade humana e que 44% apresentaram-se dentro dos padrões (Figura 2). A bactéria *Escherichia coli* foi isolada em todas as amostras consideradas fora dos padrões de potabilidade.

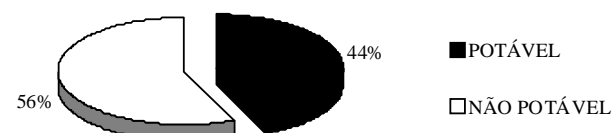


Figura 2 – Características de potabilidade humana das fontes de água.

Segundo a OPAS (1987), a contaminação das fontes dá-se pela incorporação de resíduos, principalmente de excretas humanas e de animais. Amaral et al. (1995), verificaram que, em muitas propriedades rurais, ocorre a disposição inadequada de resíduos orgânicos das atividades humana e animal, confirmando a contaminação das fontes, como a situação encontrada nesse estudo. À semelhança das análises realizadas por Falcão et al. (1993), em diferentes fontes em Araraquara – SP, no presente trabalho não se observou contaminação por coliformes fecais em águas de poços e tratadas (SABESP), em contrapartida nas análises de água de rio e minas, obteve-se o mesmo resultado de contaminação por *Escherichia coli*.

Avaliou-se no presente estudo, a possibilidade das águas de fontes potáveis estarem fora dos padrões de

potabilidade na torneira utilizada na ordenha, pela contaminação por agentes patogênicos no percurso ou pela falta de manutenção de caixas d'água. Observou-se que, 94% estavam fora dos padrões de potabilidade humana e apenas 6% estavam dentro dos padrões de potabilidade humana (Figura 3), concluindo-se que os produtores não cuidavam da manutenção de suas caixas d'água tornando-as importantes veículos de transmissão de enfermidades, tanto para os animais estudados como para consumo humano.

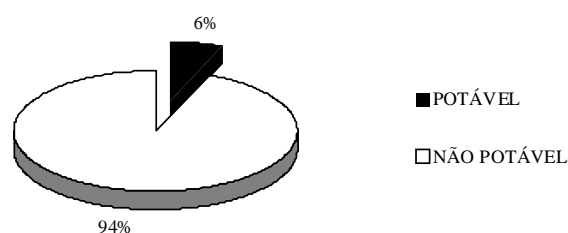


Figura 3 – Características de potabilidade humana da água utilizada na ordenha.

Pode-se verificar na Figura 4, os principais microrganismos isolados nas amostras de água: *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Enterobacter* spp. (25%), *Edwardsiella tarda* (8%) e *Klebsiella oxytoca* (8%), demonstrando a importância da *Escherichia coli* na contaminação das águas utilizadas na ordenha e para consumo humano. Alguns desses agentes foram relatados por Christovão (1997) como representantes importantes de coliformes totais e fecais. Eley (1992), citou que a presença principalmente da *Escherichia coli* indica contaminação fecal dessas águas. Wight et al. (1997), relacionam a presença de *Escherichia coli*, com ocorrências de surtos de gastroenterites em humanos.

Com relação às amostras de leite colhidas neste trabalho, verificou-se que, dos 1692 tetos avaliados, 1269 tetos (75%) foram CMT negativo, 373 tetos (22%) foram CMT positivo, 33 tetos (2%) afuncionais e 17 tetos (1%) em tratamento (Figura 5), demonstrando que as propriedades apresentavam um controle sanitário animal muito superior ao que comumente é observado no Brasil.

Na Figura 6, observa-se a porcentagem de mastites clínicas (5%) e subclínicas (95%), das 373 amostras de leite positivas no CMT.

Pelo fato da água poder atuar como via de transmissão de microrganismos patogênicos para a glândula mamária, muitos autores estudaram essa possibilidade obtendo resultados comprobatórios nessa

associação (AMARAL et al., 1995, 2003; COSTA, 1998; CULLOR, 1993; HUTABARAT et al., 1986). Observou-se que das amostras de leite CMT positivas, 9% das análises foram negativas e 91% foram positivas nas análises microbiológicas para confirmação da mastite clínica ou subclínica.

Na Figura 7, observam-se os principais agentes patogênicos, isolados nas amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica, sendo: *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%), *Staphylococcus* spp. (15%), *Staphylococcus hycus* (6%), *Streptococcus* spp. (6%), *Streptococcus uberis* (5%) e *Streptococcus dysgalactiae* (2%).

Os agentes patogênicos isolados nos casos de mastite clínica ou subclínica foram, na grande maioria, agentes considerados contagiosos. Os cuidados com a manutenção dos equipamentos de ordenha, a utilização de “pós-dipping”, a avaliação constante do rebanho, reposição de animais considerados crônicos e a terapia de vaca seca são efetivas ações para que se possa diminuir a ocorrência da mastite considerada contagiosa. É importante salientar que o controle da mastite depende mais da prevenção do que de tratamentos (COSTA, 1998; KIRK et al., 1994; TIMMIS & SCHULTZ, 1987). O resultado da etiologia da mastite, no presente estudo, vem confirmar o que Schukken et al. (1991) citaram em seu estudo, ou seja, um aumento do risco na ocorrência de mastite por *Staphylococcus aureus*, quando se utiliza água não tratada no processo de obtenção do leite ou quando a água de lavagem do úbere está contaminada por coliformes.

A contagem de células somáticas (Tabela 1), demonstrou que tanto os agentes ambientais como os agentes contagiosos resultaram em contagens extremamente altas, comprometendo a qualidade do leite nas propriedades estudadas. Os problemas com a qualidade do leite pela presença de agentes contagiosos, principalmente pelo *Staphylococcus aureus* nos casos de mastite clínica ou subclínica, com altas contagens de células somáticas no leite já foi relatada por vários autores (ADESIYUN et al., 1997; TIMMIS & SCHULTZ, 1987).

A água utilizada na ordenha advinda das propriedades estudadas, positivas no isolamento de coliformes totais e fecais não obtiveram associação alguma com os agentes isolados no leite mastítico analisados nas mesmas propriedades, impossibilitando inclusive uma análise estatística.

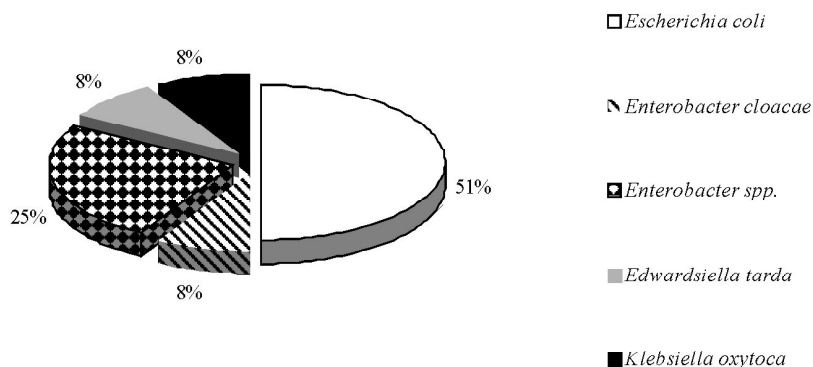


Figura 4 – Agentes bacterianos isolados nas amostras positivas de água utilizada na ordenha.

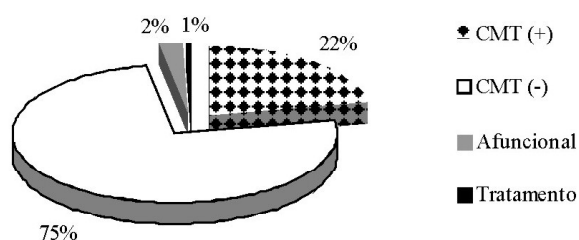


Figura 5 – Situação geral dos 1692 tetos estudados.

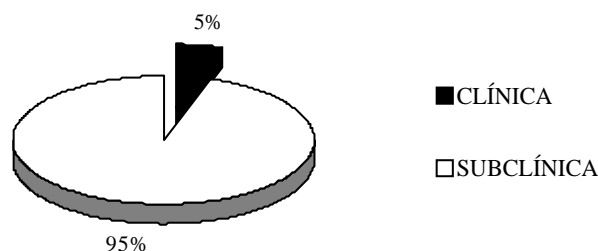


Figura 6 – Distribuição da porcentagem de mastite clínica e subclínica.

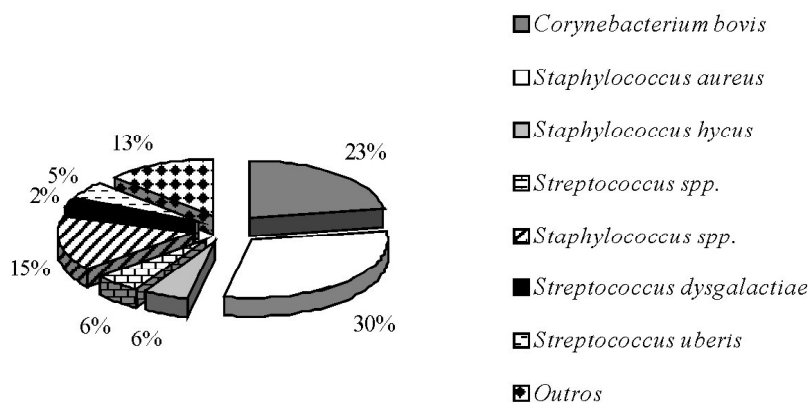


Figura 7 – Principais agentes patogênicos isolados em amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica.

Tabela 1 – Microorganismos isolados nas amostras de leite com mastite clínica ou subclínica, das 16 propriedades estudadas, e o resultado das respectivas médias na contagem de células somáticas (10^3 cel/mL).

Agentes Isolados	Nº de isolamentos	Nº de Propriedades	Média CCS 10^3 cel / mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	127	14	1.432
<i>Corynebacterium bovis</i>	93	15	1.220
<i>Staphylococcus</i> spp.	64	14	1.082
<i>Staphylococcus hyicus</i>	23	5	794
<i>Streptococcus</i> spp.	23	6	1.556
<i>Streptococcus uberis</i>	21	4	2.247
<i>Alcalygenes faecalis</i>	14	2	2.741
<i>Micrococcus</i>	9	8	747
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	8	3	1.992
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	2	3.596
<i>Citrobacter diversus</i>	4	2	2.320
<i>Escherichia coli</i>	4	1	777
<i>Nocardia</i> spp.	3	3	7.115
<i>Pasteurella multocida</i>	3	2	7.569
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	1	3.989
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1	1.669
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	3.918
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	2	2.308
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	7.000
<i>Serratia</i> spp.	1	1	661
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	1	1.078
Total	414	-	1.631

CONCLUSÕES

Os agentes coliformes encontrados na água, utilizada na ordenha, não estavam presentes nas análises das amostras de leite dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica das respectivas propriedades, demonstrando não haver associação entre a qualidade da água e a ocorrência de mastite. Os agentes ambientais relacionados com a utilização de água fora dos índices de potabilidade na ordenha não foram significativos quando associados aos agentes ambientais isolados de quartos mamários positivos para mastite clínica ou subclínica. A bactéria *Escherichia coli* foi isolada em todas as amostras de água das fontes estudadas que se apresentavam fora dos padrões de potabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L. A.; ROMAIN, H. I. Relatedness of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and human handlers in dairy farms in Trinidad. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, p. 551-556, 1997.

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; PENHA, L. H. C. Características microbiológicas da água utilizada no processo obtenção do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 2/3, p. 85-88, 1995.

AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of Sao Paulo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 620-623, Oct. 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16. ed. New York, 1992.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

CARTER, G. R.; COLE JÚNIOR, J. R. Diagnostic procedures. In: _____. **Veterinary bacteriology and mycology**. 5. ed. New York: Academic, 1990. p. 620.

- CHRISTOVÃO, D. A. Bacteriologia da água: seu exame e controle bacteriológicos. In: _____. **Água: qualidade, padrões de potabilidade e poluição**. São Paulo: CETESB, 1977.
- COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.
- CULLOR, J. S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medical Food Animals Practice**, v. 88, p. 571-579, 1993.
- ELEY, A. **Intoxicaciones alimentares de etiologia microbiana**. Zaragoza: Acríbia, 1992. 208 p.
- FALCÃO, D. P.; VALENTINI, S. R.; LEITE, C. Q. F. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. **Water Research**, v. 27, n. 12, p. 1737-1741, 1993.
- HUTABARAT, T. S. P.; WITONO, S.; UNRULT, D. H. A. Preliminary study on management factors associated with mastitis and milk production losses in small holder hand milking dairy farms in Central Java, Indonésia. **International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**, n. 4, p. 151-154, 1986.
- KIRK, J. H.; DEGRAVES, F.; TYLER, J. Recents progress in treatment and control of mastitis in cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 204, p. 1152-1158, 1994.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guia para la calidad del agua potable**. Washington, DC, 1987. v. 2.
- SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-207, 1957.
- SCHUKKEN, Y. H.; GROMMER, F. J.; GREER, D. van der. Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count: 2-risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, Madison, v. 74, p. 826-832, 1991.
- TIMMIS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Madison, v. 70, p. 2648-2657, 1987.
- WIGHT, J. P.; RHODES, P.; CHAPMAN, P. A.; LEE, S. M.; FINNER, P. Outbreaks of food poisoning in adults due to *Escherichia coli* O11 and *Campylobacter* with coach trips to northern France. **Epidemiology Infection**, v. 119, p. 9-14, 1997.