

Foto: Viviane de Souza



Avaliação do teor de cloretos e da condutividade elétrica no leite de cabra como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica caprina

Viviane de Souza¹
Patrícia Yoshida Faccioli Martins²
José Wellington Fontinele Moura³
Darciane Rodrigues Fernandes⁴
Adriano Rodrigues Lima⁵

Introdução

A mastite é uma doença infectocontagiosa causada por micro-organismos patogênicos que afetam a saúde da glândula mamária e provocam alterações macro e microscópica no leite.

A classificação da mastite pode ser de acordo com o grau de infecção, em clínica e subclínica. A clínica é caracterizada por apresentar sintomas visíveis no úbere do animal como edema, dor, rubor e aumento da temperatura e alterações no leite, como presença de grumos, pus, sangue e alteração na cor. Já a mastite subclínica, só é possível ser detectada por meio de testes laboratoriais no leite.

Durante o processo inflamatório da glândula mamária, ocorre o aumento da permeabilidade

dos vasos sanguíneos, permitindo que a taxa de passagem de íons de cloretos presentes no sangue seja maior que o normal, ocasionando mudanças na composição físico-química do leite (DELLA LIBERA et al., 2011; WEGNER; STUUL, 1978). Sendo assim, por meio de testes sensíveis aos íons de cloretos, é possível detectar os animais que apresentam mastite subclínica. Segundo Barcellos et al. (1987), quando a presença de cloreto de sódio no leite está acima de 0,2%, é um indicativo de mastite subclínica.

As medições da Condutividade Elétrica (CE) no leite, por sua vez, têm sido utilizadas como uma ferramenta para identificar animais que apresentam mastite subclínica e início de mastite clínica, e têm como vantagem a automatização da sala de ordenha, oferecendo resultados rápidos que

¹ Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

² Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária Preventiva, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

³ Zootecnista, mestre em Zootecnia, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁴ Tecnóloga em Alimentos, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁵ Estatístico, especializado em Matemática Financeira e Estatística, analista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

contribuem na melhoria da segurança e qualidade do leite (DIAZ et al., 2012). A CE mede a capacidade de uma solução em conduzir uma corrente elétrica entre dois eletrodos, sendo mensurada em miliSiemens (mS). Os ânions (Cl⁻) e cátions (Na⁺, e K⁺) são os mais relevantes para determinação (NORBERG, 2004). O leite de vaca normal deve apresentar valores entre 4,0 mS/cm-5,5 mS/cm a 25 °C (SHERBON, 1988), enquanto que o leite de cabra pode variar entre 4,9 mS/cm-13,09 mS/cm a 25 °C (LE MENS, 1991).

A avaliação microbiológica é considerada “padrão-ouro” por ser o melhor teste para o diagnóstico da mastite subclínica caprina, pois vários agentes etiológicos podem causar a doença e a presença de micro-organismos no leite é um indicativo de infecção intramamária (CONTRERAS et al., 2007). A mastite clínica caprina é causada principalmente por *Staphylococcus aureus* e em casos subclínicos da doença, por estafilococos coagulase-negativos (ECN).

Por ser um método oneroso e demorado, que depende de laboratório, testes em nível de campo, capazes de identificar alterações no leite estão sendo estudados para avaliar a confiabilidade para o diagnóstico da doença em casos de mastite subclínica.

Considerando a escassez de informações para o diagnóstico da mastite subclínica caprina e a importância de diagnósticos rápidos para que os produtores rurais tomem decisões como medida de controle para evitar a disseminação e evolução da mastite no rebanho, o presente trabalho¹ teve como objetivo avaliar os testes de detecção do teor de cloretos e da condutividade elétrica (CE) em relação ao isolamento de *Staphylococcus* spp.

Metodologia

Durante o período de outubro de 2015 a março de 2016, realizaram-se seis coletas de amostras de leite, de um total de 20 cabras das raças Saanen (n=9) e Anglo Nubiana (n=11), no terço médio da lactação, pertencentes ao rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos. As fêmeas eram criadas em condições de manejo semi-intensivo com períodos de pastejo na caatinga em pasto de capim gramão,

alimentadas no cocho com feno de capim tifton e suplementadas com concentrado formulado para atender as exigências nutricionais dos animais em lactação segundo recomendado pelo National Research Council (1981), concentrado formulado à base de milho, soja, cálcio e fósforo, ofertado 440 g de ração por animal ao dia durante todo o experimento.

Realizou-se o exame clínico da glândula mamária e o teste da caneca, sendo que nenhum animal durante a execução do experimento apresentou diagnóstico de mastite clínica. Antes da coleta das amostras, todos os animais foram submetidos aos procedimentos básicos de boas práticas agropecuárias (BPA): antissepsia dos tetos antes da ordenha utilizando uma solução desinfetante de iodo a 0,5%; secagem de cada teto com papel toalha absorvente e descartável; antissepsia dos tetos após a ordenha, utilizando uma solução desinfetante de iodo a 0,5% glicerinado.

Foram colhidas amostras de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (OLIVER et al., 2004), em tubos falcon esterilizados, contendo 2 mL a 5 mL de leite de cada metade mamária das fêmeas (amostras individuais) para isolamento e identificação bacteriana, bem como um frasco de 60 mL para detecção do teor de cloretos e condutividade elétrica, totalizando 232 amostras de leite durante todo o experimento.

Essas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas para a Embrapa Caprinos e Ovinos.

Identificação e isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp.

As amostras obtidas do leite foram semeadas diretamente em placas de petri, contendo ágar Baird-Parker (Himedia) com auxílio de alça de sementeira e incubadas a 37 °C por 24h a 48 h. Em seguida, três a cinco colônias foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram positivos foram submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoina (Teste de Voges-Proskauer - VP) (MAC FADDIN, 1976).

¹ Protocolo CEUA/CNPC – 001/2017

Condutividade Elétrica

Para a realização do teste, foram utilizados aproximadamente 40 mL de leite. As amostras foram submetidas à leitura no analisador ultrassônico de leite Lactoscan (Figura 1) SA (Entelbra), sendo os resultados mensurados e expressos por miliSiemens (mS).

Foto: Viviane de Souza



Figura 1. Analisador de leite Ultrassônico-Lactoscan.

Pesquisa de teor de cloretos

Para a realização do teor de cloretos, foram adicionados 10 mL de leite em um béquer e, em seguida, cinco gotas de solução cromato de potássio a 5%. Após prévia homogeneização, as

amostras de leite foram submetidas à análise quantitativa do teor de cloretos pela técnica de titulação pelo nitrato de prata 0,1N. O princípio da prova consiste na reação do nitrato de prata com íons cloreto presentes no leite, formando sal de prata. O excesso de íons de prata produz, com o indicador cromato de potássio, um complexo de coloração alaranjado-escuro (AMARAL et al., 1988). O volume utilizado de nitrato de prata durante a titulação da amostra de leite foi multiplicado pelo fator 0,0355 que corresponde ao peso molecular do cloreto no NaCl, para calcular a concentração do teor de cloretos presente nas amostras (Figuras 2 e 3) (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1972).



Foto: Viviane de Souza

Figura 2. Pesquisa de teor de cloretos em amostras de leite de cabra



Figura 3. Pesquisa de teor de cloretos em amostras de leite de cabra.

Análise estatística

A comparação das médias das variáveis Cloretos e Condutividade entre os grupos positivo e negativo do isolamento microbiológico foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F para raças e Tukey para o período. Considerou-se um nível de significância de 5%. O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2 (2009).

A sensibilidade dos testes diagnósticos foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os doentes, a especificidade como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os saudáveis e a eficiência ou acurácia como a proporção de acertos do teste diagnóstico (MEDRONHO e PEREZ, 2002).

O isolamento das estirpes de *Staphylococcus* spp. do leite foi considerado como o teste padrão para determinação da acurácia dos demais testes de diagnósticos realizados, uma vez que a presença desses micro-organismos está associada à infecção intramamária caprina (CONTRERAS et al., 2007).

Resultados

Isolamento Microbiológico

Do leite avaliado, foram isoladas e identificadas 18 estirpes de *Staphylococcus* spp. Todas foram coagulase-negativas e catalase-positivas, e apenas uma foi positiva ao teste de produção de acetoina (VP). Todas as colônias isoladas foram cocos gram-positivos em formato de cachos de uva.

A ocorrência de estafilococos coagulase negativas (ECN) é comum em casos de mastite subclínica. Estudo realizado por Salaberry et al. (2016), observou que do total de 214 amostras coletadas, 122 apresentaram multiplicação bacteriana, e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) ECN e 20 (16,4%) estafilococos coagulase positivo (ECP).

Cloretos

O teor de cloretos encontrado nesse estudo variou entre 0,159 g/100 mL a 0,429 g/100 mL, com média de 0,267 g/100 mL.

Estudo realizado por Lima Júnior et al. (1994) foi observado valor médio de 0,204 mg/100 mL de teor de cloretos no leite de cabra, reafirmando os achados de Barros e Leitão (1992), cujos valores também mostraram-se elevados.

É possível observar que as médias para o teste de cloretos não diferiram entre glândulas mamárias saudáveis e com isolamento microbiológico (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de cloretos obtidos no leite entre diferentes raças com e sem isolamento microbiológico.

Resultado microbiológico	Saanen	Anglo Nubiana	Geral
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,274 ^a	0,315 ^a	0,295 ^a
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	0,274 ^a	0,276 ^a	0,275 ^a

Não houve diferença entre as raças avaliadas pelo teste F Pr=0,138

Como o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) não preconiza teor de cloretos para o controle de qualidade do leite de cabra, no presente estudo, adotou-se como valor médio, 0,221 g/100 mL, conforme trabalho realizado por Diaz et al. (2012).

Sendo assim, das 232 amostras de leite analisadas pelo teste de cloretos, no presente estudo, 22 (9,5%) apresentaram médias inferiores a 0,221 g/100 mL e 210 (90,5%) superiores a 0,221 g/100 mL (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de *Staphylococcus* spp. encontrados no isolamento microbiológico de amostras de leite de acordo com o teor de cloretos.

Resultado microbiológico	Cloretos g/100 mL		Total
	Acima de 0,221	Abaixo de 0,221	
<i>Staphylococcus</i> spp.	16 (8,0%)	2 (9,0%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	194 (92,0%)	20 (91,0%)	214
Total	210	22	232

Verificou-se que 22 amostras apresentaram valores inferiores a 0,221 g/100mL, mas ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, constatou-se a presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. em dois (9,0%). Nas amostras com valores superiores a 0,221 g/100mL, das 210 amostras, 194 (92,0%) não apresentaram isolamento (Tabela 2).

A raça não interferiu no teor de cloretos, porém foi possível observar valores crescentes durante o estágio inicial, médio e final da lactação (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de cloretos no leite de cabra de diferentes raças e estágio de lactação.

Análises	Cloretos	
	Raças	
Anglo Nubiana	0,279 ^a	
Saanen	0,274 ^a	
Período		
Out/15	0,236 ^c	
Nov/15	0,272 ^b	
Dez/15	0,253 ^{bc}	
Jan/16	0,296 ^a	
Fev/16	0,310 ^a	
Mar/16	0,298 ^a	
CV (%)	11,013	

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey $P < 0,001$

Condutividade Elétrica

O teste de CE do presente estudo apresentou valores entre 4,67 mS/cm e 8,13 mS/cm, média de 5,79 mS/cm e mediana de 5,74 mS/cm.

No presente estudo, não houve diferença entre a CE proveniente de glândulas mamárias saudáveis das que apresentaram isolamento microbiológico (5,79 5,79 mS/cm e 6,01 mS/cm, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4. Condutividade Elétrica (CE) em leite de cabras Anglo Nubiana e Saanen.

Resultado microbiológico	Condutividade elétrica mS/cm
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,01 ^a
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	5,79 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste F $P < 0,05$

No presente estudo, adotou-se como valor médio, 5,20 mS/cm, conforme preconizado por Romero et al. (2012). Das 232 amostras de leite analisadas pelo teste de CE, 13 (5,6%) foram inferiores a 5,20 mS/cm e 219 (94,4%) foram superiores a 5,20 mS/cm (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de *Staphylococcus* spp. em número absoluto e respectiva porcentagem, encontradas no cultivo microbiológico de amostras de leite de acordo com o teste de Condutividade Elétrica.

Resultado microbiológico	Condutividade elétrica mS/cm		Total
	Acima de 5,20 mS/cm	Abaixo de 5,20 mS/cm	
<i>Staphylococcus</i> spp.	18 (8,0%)	0 (0%)	18
Sem isolamento bacteriano em meio Baird-Parker	201 (92,0%)	13 (100%)	214
Total	219	13	232

Verificou-se que 13 amostras apresentaram valores abaixo de 5,20 mS/cm e ao realizar o isolamento e identificação microbiológica, não houve presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Nas 219 amostras com valores superiores a 5,20 mS/cm, 201 (92,0%) não apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp. (Tabela 5).

Verificou-se que os valores para a CE obtidos para os animais da raça Saanen foram superiores ($p < 0,001$) aos da raça Anglo Nubiana (Tabela 6), com valores de 5,80 mS/cm e 5,72 mS/cm, respectivamente.

A CE foi influenciada pelos estágios de lactação, apresentando diferença entre os meses de coleta, conforme Tabela 6. Durante os meses de novembro de 2015 e janeiro de 2016, a CE foi maior quando comparada aos meses de outubro de 2015, fevereiro e março de 2016.

Tabela 6. Comparação do teste de Condutividade Elétrica entre as raças durante a curva de lactação.

Análises	Condutividade Elétrica
Raças	
Anglo Nubiana	5,72 ^b
Saanen	5,88 ^a
Período	
Out/15	5,64 ^b
Nov/15	5,96 ^a
Dez/15	5,81 ^{ab}
Jan/16	5,98 ^a
Fev/16	5,61 ^b
Mar/16	5,77 ^{ab}
CV (%)	7,20

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey $Pr < 0,001$

Conclusões

Quando se utiliza um teste diagnóstico, é de fundamental importância saber a probabilidade que um animal com resultado positivo seja realmente infectado, bem como um animal com resultado negativo seja de fato, não infectado.

Com base nos resultados, verificou-se que:

- A Condutividade Elétrica, por sua confiabilidade em determinar os animais verdadeiramente sadios, pode ser recomendada como prova de triagem para mastite subclínica e associado ao exame microbiológico “padrão-ouro” para confirmar o diagnóstico.
- O teste de cloretos não foi eficiente em identificar as cabras com mastite subclínica.

Referências

AMARAL, L. A.; LEW, B. J.; NADER FILHO, A. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 105-112, jun. 1988.

BARCELLOS, T. de F. S.; SILVA, N. da; MARQUES JÚNIOR, A. de P. Mastite caprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte – Minas Gerais. I. Etiologia e sensibilidade a antibióticos. II. Métodos de diagnóstico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 307-315, abr. 1987.

BARROS, G. C.; LEITÃO, C. H. S. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 45-48, 1992.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1/2, p. 145-153, mar. 2007.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 297-300, 2011.

DÍAZ, J. R.; ROMERO, G.; MUELAS, R.; ALEJANDRO, M.; PERIS, C. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 2, p. 718-726, 2012.

LE MENS, P. Propriedades físico-químicas, nutricionales y químicas. In: LUQUET, F.M.;

KEILLING, J.; WILDE, R. **Leche y Productos lácteos: vaca, oveja y cabra**. Zaragoza: Acibia, p. 343-359, 1991.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A. Estudo comparativo entre algumas características físico-químicas, celulares e bacteriológicas do leite de cabras reagentes e negativas ao California Mastitis Test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, n. 3, p. 290-300, 1994.

MacFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: William and Wilkins, 1980. 527 p.

MEDRONHO, R. A.; PEREZ, M. A. **Testes diagnósticos**. In: MEDRONHO, R. A. (Ed.). *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 259-270.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções reagentes e solventes**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1972. 627 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Goat Nutrition. **Nutrients requirements of goats: angora, dairy, and meat goats in temperate and tropical countries**. Washington, DC: National Academy Press, 1981. 91 p. (Nutrient requirements of domestic animals, 15).

NORBERG, E., HOGVEEN, H., KORSGAARD, I.R., FRIGGENS, N.C., LBVENDAHL, P. Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1099-1107, 2004.

OLIVER, S. P.; GONZALEZ, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona: National Mastitis Council, 2004. 47 p.

ROMERO, G.; PANTOJA, J. C. F.; SENDRA, E.; PERIS, C.; DÍAZ, J. R. Analysis of the electrical conductivity in milking fractions as a mean for detecting and characterizing mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 107, n. 2/3, p. 157-163, Oct. 2012.

SALABERRY, S. R. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; ZUNIGA, E.; GONSALES, F. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 2, p. 336-244, mar./abr. 2016.

SHERBON, J. W. Physical properties of milk. In: WONG, N.P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. (Ed.), **Fundamentals of dairy chemistry**. 3th ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, 1988. p. 409-460.

STATISTICAL analysis system. Version 9.2. Cary: SAS, 2009.

WEGNER, T. N.; STULL, J.W. Relation between mastitis test score mineral composition of milk, and blood electrolytes profiles in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 12, p. 1755-1759, 1978.

Comunicado Técnico, 162

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Caprinos e Ovinos**

Endereço: Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4. Caixa Postal 145. CEP 62010-970. Sobral - CE.

Fone: (88) 3112-7400

Fax: (88) 3112-7455

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

On-line (2017)

CGPE 14300



Comitê de Publicações

Presidente: Vinícius Pereira Guimarães
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Ana Maria Bezerra Oliveira Lôbo, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diônes Oliveira Santos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Viviane de Souza.

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos
Normalização: Tânia Maria Chaves Campelo
Editoração eletrônica: Maira Vergne Dias