

Estudo do leite de éguas sadias ou portadoras de mastite subclínica, pelo teste de Whiteside, análise microbiológica e contagem de células somáticas*

Study of the milk in healthy mares or mares with subclinics mastitis using Whiteside test, microbiological culture and somatic cell count

Nereu Carlos PRESTES¹; Hélio LANGONI²; Luiz Augusto Vieira CORDEIRO³

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Nereu Carlos Prestes
Departamento de Clínica e Cirurgia
Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da UNESP. Distrito de
Rubião Júnior. 18618-000 -
Botucatu - SP.
e-mail:nereu@fmvz.unesp.br

1-Departamento de Reprodução
Animal e Radiologia Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária
e Saúde Pública da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
UNESP, Campus Botucatu - SP
2-Departamento de Higiene Veterinária
e Saúde Pública da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
UNESP, Campus Botucatu - SP
3-Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da UNESP - Botucatu - SP

RESUMO

Com o objetivo de identificar a microbiota existente no leite de éguas normais ou portadoras de mastite subclínica, coletaram-se amostras (10 a 15 ml) de leite de 38 animais, que foram examinadas pelo teste de Whiteside, após a homogeneização das amostras dos dois tetos de cada animal. Os resultados foram negativos. Os exames microbiológicos realizados em meios de ágar sangue bovino 10% e ágar MacConkey revelaram presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. A contagem de células somáticas de amostras individuais de cada teto revelou números superiores a 500.000 células/ml de leite em somente 9,3% das 73 amostras de leite examinadas. Os resultados sugerem a realização de novos estudos objetivando-se a padronização do número de células somáticas no leite de éguas.

UNITERMOS: Leite de égua; Análise microbiológica; Contagem células somáticas.

INTRODUÇÃO

No Ocidente, o leite equino geralmente não é utilizado para consumo humano, porém em países como a Alemanha e França é usado em hospitais na alimentação de crianças nascidas de parto prematuro. Dentre os mamíferos, o leite de éguas é o que apresenta maior semelhança com o leite da mulher, no tipo de amamentação contínua com intervalos curtos em virtude de sua maior digestibilidade, no baixo teor protéico, predominando albumina, no alto teor de lactose e no equilíbrio albumina-globulina⁶.

A égua, em geral, é simplesmente requerida para suprir a quota de leite necessária ao potro, e sendo a única fonte de nutrição nas suas primeiras semanas de vida, é de extrema importância para este¹.

A ocorrência de mastites em éguas é considerada baixa quando comparada a vacas. Ocorre em fêmeas secas e

lactantes, e a sua incidência é maior no período seco ou seguinte a uma injúria dos tetos, durante a lactação. Os microrganismos mais comumente isolados do leite e de secreções de glândulas mamárias de vacas são os *Streptococcus* beta-hemolíticos e *Staphylococcus* spp.¹. Na suspeita de mastite, é fundamental que se proceda ao cultivo bacteriano⁴.

Welsh¹² relatou um caso envolvendo duas éguas que estavam no quarto mês de lactação, e que apresentavam exsudato purulento em ambas as glândulas mamárias, cuja citologia evidenciava grande quantidade de neutrófilos, com o isolamento de *Streptococcus zooepidemicus* em cultura pura.

Em estudo realizado no período de 1985 a 1988, com 33 éguas de várias raças, com diferentes idades entre 4 e 14 anos, com mastite aguda, foram isolados os seguintes microrganismos: 36 *Streptococcus* spp., destes 25 beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* (9), Coliformes (6), *Escherichia coli* (3), *Klebsiella* spp. (2) e representantes da

*Apoio FAPESP

Tabela 1

Resultados dos exames microbiológicos de amostras de leite de éguas e a ocorrência de diarreia nos potros no momento da colheita. Botucatu - SP - 1995/96.

Animal	Microorganismos	Diarreia *	Idade (dias)
1	<i>Staphylococcus spp.</i>	-	9
2	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i>	-	25
3	<i>Bacillus thuringensis</i>	-	10
4	<i>Bacillus thuringensis</i>	-	12
5	<i>Bacillus thuringensis</i>	-	12
6	Negativo	-	105
7	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>S. zooepidemicus</i>	-	108
8	<i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	-	28
9	<i>Streptococcus spp.</i>	-	15
10	Negativo	-	30
11	<i>Bacillus thuringensis</i>	-	30
12	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i>	-	29
13	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>Corynebacterium spp.</i>	-	82
14	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	-	76
15	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i>	-	16
16	<i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Pausterella spp.</i>	-	160
17	Negativo	-	83
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	42
19	<i>Streptococcus spp.</i>	-	22
20	<i>Staphylococcus spp.</i>	-	31
21	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	-	45
22	Negativo	-	23
23	<i>Corynebacterium spp.</i>	-	11
24	Negativo	-	9
25	<i>Streptococcus spp.</i>	-	42
26	Negativo	-	53
27	<i>Candida albicans</i>	-	60
28	Negativo	-	73
29	Negativo	-	55
30	Negativo	-	60
31	<i>Corynebacterium spp.</i>	-	89
32	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Shigella spp.</i>	-	30
33	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	-	24
34	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	-	33
35	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i>	-	45
36	<i>Corynebacterium spp.</i>	-	50
37	Negativo	-	38
38	Negativo	-	28

* - Ausência de diarreia.

família *Neisseriaceae* (3). O exame das amostras de leite obtidas em 31 éguas saudáveis durante os primeiros 7 dias após a parição mostraram que 13 (41,9%) delas apresentavam mastite e de 21,0% foram isoladas bactérias contaminantes, sendo que o *Streptococcus spp.* apresentou maior prevalência².

McCue; Wilson⁵, em revisão de 28 casos de mastite clínica em éguas, encontraram maior prevalência de

Streptococcus spp. (36,8%), seguido por *Staphylococcus spp.* e *Actinobacillus suis* (10,5%).

A contagem de células somáticas (CCS), incluindo leucócitos, macrófagos, linfócitos e células epiteliais se constitui em método seguro para o diagnóstico das mastites⁹. Durante o período neonatal, a contagem de células somáticas na secreção mamária equina é menor que 0,36 x 10/ml. Para

Tabela 2

Resultados da contagem de células somáticas (nº de células/ml) de amostras de leite de éguas. Botucatu - SP - 1995/96.

Animal	Teto	Células/ml	Animal	Teto	Células/ml
01	D	1.436.500	20	D	<110.500
	E	994.500		E	<110.500
02	D	*	21	D	<110.500
	E	1.326.000		E	<110.500
03	D	331.500	22	D	221.000
	E	331.500		E	<110.500
04	D	<110.500	23	D	<110.500
	E	331.500		E	221.000
05	D	1.105.000	24	D	<110.500
	E	442.000		E	110.500
06	D	331.500	25	D	<110.500
	E	2.762.500		E	<110.500
07	D	442.000	26	D	<110.500
	E	110.500		E	221.000
08	D	221.000	27	D	<110.500
	E	552.500		E	<110.500
09	D	110.500	28	D	110.500
	E	110.500		E	<110.500
10	D	331.500	29	D	<110.500
	E	221.000		E	<110.500
11	D	994.500	30	D	<110.500
	E	110.500		E	<110.500
12	D	110.500	31	D	110.500
	E	110.500		E	110.500
13	D	110.500	32	D	<110.500
	E	<110.500		E	110.500
14	D	<110.500	33	D	110.500
	E	<110.500		E	<110.500
15	D	<110.500	34	D	*
	E	110.500		E	<110.500
16	D	<110.500	35	D	<110.500
	E	<110.500		E	110.500
17	D	<110.500	36	D	552.500
	E	<110.500		E	<110.500
18	D	<110.500	37	D	<110.500
	E	<110.500		E	<110.500
19	D	<110.500	38	D	<110.500
	E	<110.500		E	*

* sem produção láctea.

Kehrli; Shustar³, as células somáticas do leite desempenham um papel de proteção contra doenças da glândula mamária bovina por sua atividade fagocitária.

Levando-se em consideração a importância das mastites para a espécie equina e a escassez de literatura sobre o tema, o presente trabalho teve por objetivo estudar os aspectos citológicos e microbiológicos do leite de éguas normais ou portadoras de mastite subclínica e verificar se o potro

apresentava distúrbio digestivo pela ingestão de leite contendo bactérias.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 38 éguas adultas de diferentes raças. As amostras em volume de 10 a 15 ml foram colhidas individualmente de cada teto, após higienização do úbere com

água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção com algodão embebido com álcool 70%. Após desprezar os primeiros jatos de leite, colheu-se a amostra, em frascos estéreis, identificados com os dados de cada animal, fechados imediatamente e acondicionados em caixa de isopor com gelo reciclável e transportados para o laboratório.

Inicialmente procedeu-se ao exame microbiológico, semeando-se 0,1 ml de leite da amostra dos dois tetos, homogeneizada, em meio de ágar sangue bovino 10% e ágar MacConkey, observando-se o desenvolvimento bacteriano após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C, estudando-se, morfológicamente, as colônias isoladas pelo método de Gram, e repicando-se para meio de caldo cérebro-coração para obtenção de mênstruo bacteriano para a realização de provas taxonômicas.

A prova de Whiteside modificada¹¹ foi realizada utilizando-se 5 gotas de leite e 1 gota de hidróxido de sódio a 4%, homogeneizando-se por 20 segundos com bastão de vidro, procurando-se verificar a formação de grumos ou gelificação.

Para contagem de células somáticas, procedeu-se ao método de Prescott; Breed⁷, utilizando-se 0,01 ml de leite distribuídos em 100 mm² sobre lâmina de vidro desengordurada. Após a confecção do filme de leite, as lâminas eram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas em superfície plana, para desidratação e fixação. Posteriormente, foram coradas pela técnica de Broadhurst-Palley, modificada por Santos; Vilela¹⁰. A contagem das células mononucleares (MN) e de polimorfonucleadas (PMN) foi realizada em microscopia óptica utilizando-se objetiva de imersão, contando-se 100 campos, e o resultado obtido foi multiplicado pelo fator de trabalho do microscópio, determinando-se assim o número de células por ml de leite. Dos potros coletou-se o histórico da ocorrência ou não de diarreia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 38 amostras de leite examinadas, 11 (28,9%) não apresentaram desenvolvimento microbiano, sendo que das 27 restantes, obtiveram-se 51 isolamentos identificados e distribuídos da seguinte forma: 17 (33,3%) como *Staphylococcus* spp.; 15 (29,4%) *Streptococcus* spp.; 10 (19,6%) *Corynebacterium* spp.; 5 (9,8%) *Bacillus* spp. e 4 (7,9%) como *Pasteurella* spp., *Candida* spp., *Enterobacter cloacae* e *Shigella* spp. Estes resultados, inclusive com sua associação, podem ser apreciados na Tab. 1, que mostra ainda a idade do potro no momento da colheita da amostra de leite, bem como sua situação, ou seja, se apresentava diarreia ou não. Pode ser observada a presença de diarreia nos potros

quando as éguas mães apresentam o primeiro cio pós-parto. Ressalta-se que nem todos os microrganismos foram classificados taxonomicamente. A apresentação na Tab. 1 foi mantida de acordo com os isolamentos obtidos individualmente e não agrupados por espécies.

Embora - não se tenha a classificação das espécies bacterianas de todos os gêneros isolados, verificou-se a importância do *Staphylococcus* spp. e do *Streptococcus* spp., que foram os mais frequentemente isolados (33,3% e 29,4%, respectivamente), o que coincide em parte com outros autores, diferindo, entretanto, a importância entre os dois gêneros, pois para Bostedt *et al.*², o *Streptococcus* spp. foi o mais prevalente nos casos de mastite aguda. Resultados semelhantes foram obtidos por McCue; Wilson⁵, com o isolamento em 36,8% das amostras estudadas.

Não foi possível estabelecer correlação entre a ingestão de leite pelos potros e a ocorrência de diarreia, mesmo naqueles casos onde se isolou *Shigella* spp., bactéria considerada como agente oportunista, causadora de gastroenterites em diferentes espécies animais e seres humanos⁸. Tal fato pode ser explicado como decorrente da baixa concentração do agente no leite, associado à higidez orgânica dos potros, possibilitando resistência à infecção.

Os resultados dos estudos citológicos das amostras de leite dos tetos direito (D) e esquerdo (E) de cada égua podem ser apreciados na Tab. 2. Para o leite bovino, admite-se como normal contagens celulares até 500.000/ml de leite, sendo que contagens superiores classificam mastite subclínica nesta espécie³. Embora não exista padronização para a espécie equina, pôde-se verificar que das 73 amostras de leite examinadas três éguas apresentavam um dos tetos sem produção láctea e somente 7 (9,6%) ultrapassaram o limite de 500.000 céls./ml. Os exames de Whiteside foram todos negativos, cujos resultados correlacionados com a contagem de células somáticas no leite permitiram constatar que o número de células somáticas para leite da espécie equina é menor do que aquele descrito para a espécie bovina.

Concluindo, os resultados mostraram que na microbiota láctea de éguas havia predominância de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., entre outros microrganismos, que em alguns animais foram obtidos em isolamento puro e em associação com outros agentes bacterianos. A microbiota identificada, os resultados negativos de provas de Whiteside e as baixas contagens de células somáticas em mais de 90% das amostras devem trazer reflexão para a relevância de pesquisas estabelecendo padrões para contagem de células somáticas como indicativos de infecção intramamária na espécie equina.

SUMMARY

To identify the bacterial population in the milk of healthy mares and with subclinical mastitis, samples (10 to 15 ml) of 38 animals were collected, homogenized and examined using the Whiteside test. The results were negative. The microbiological culture was carried out in 10% agar bovine serum and in agar MacConkey. Both exams revealed the presence of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., predominantly. The somatic cell counts (SCC) was performed in individual samples of each teat and showed a number higher than 500,000 cels/ml of milk in only 9.3% of the 73 samples examined. These results obtained suggest that new researches should be done aiming the standardization of the somatic cell in equine milk.

UNITERMS: Mare milk; Microbiological analysis; Somatic cell counts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M.; HENDERSON, J.A. **Clínica veterinária**, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1989. p.1260.
- 2- BOSTEDT, H.; LEHMANN, B.; PEIP, D. Mastitis in mares. **Tierärztliche Praxis**. v.16, n.4, p.367-71, 1988.
- 3- KEHRLI Jr., M.E.; SHUSTAR, D.E. Factor affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.2, p.619-27, 1994.
- 4- KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**, USA : Lea & Febiger, 1990. 844p.
- 5- McCUE, P.M.; WILSON, W.D. Equine mastitis - a review of 28 cases. **Equine Veterinary Journal**, v.21, n.5, p.351-3, 1989.
- 6- MORAIS, M.T.; SIMONE, E.M.; ROMANO, L.A. Estudo da composição do leite de égua e comparação com o leite da mulher. **A Hora Veterinária**, ano 16, n.25, p.37-43, 1997.
- 7- PRESCOTT, S.C.; BREED, R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **Journal of Infections Disease**, v.7, p.632, 1910.
- 8- QUIN, P.J.; CARTER, M.F.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**, Spain : Wolfe, 1994. 648p.
- 9- ROSSI, R. Mastitis: prevention and diagnosis. Somatic cells as important indicator. **Professione Allevatore**. v.20, p.26-9, 1993.
- 10- SANTOS, E.C.; VILELA, M.A.P. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério de avaliação da qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.3, p.907-19, 1983.
- 11- SILVA FILHO, F.S.; PORTO, E. Valor da prova de Whiteside modificada, na descoberta da mastite bovina crônica. I. Reação de Whiteside e conteúdo leucocitário. **Boletim da Indústria Animal**, v.22, p.171-80, 1964.
- 12- WELSH, R.D. The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. **Equine Practice**, v.6, n.9, p.6-16, 1984.

Recebido para publicação: 16/10/1997

Aprovado para publicação: 26/11/1998