

# NOVO PRODUTO P22-P32 REDUZ RAPIDAMENTE A INCIDÊNCIA DE MASTITE INFECCIOSA BOVINA NOS REBANHOS DO PARANÁ, BRASIL.

PARADA, J.L.<sup>1</sup>, SOCCOL, C.R.<sup>2</sup>, GONÇALVES, D.<sup>3 (\*)</sup>

Correspondência: [dicezar.zmv@uol.com.br](mailto:dicezar.zmv@uol.com.br) , [jose.parada@terra.com.br](mailto:jose.parada@terra.com.br).

## RESUMO

A incidência e a prevalência de infecções do úbere bovino no Paraná têm apresentado constantes aumentos. A resistência dos agentes infecciosos a antibióticos como os betalactâmicos e outros, assim como a forma com que colonizam a glândula mamária, e a associação de outros microrganismos, têm sido fatores determinantes, para causar grandes prejuízos econômicos. Objetivando solucionar este problema, se testou o produto P22-P32 com antimicrobianos alternativos obtidos de microrganismos por meio de processos biotecnológicos. Os testes foram realizados em 76 casos de mastite crônica usando como controle 76 casos que receberam apenas placebo, totalizando 152 casos. Estudos microbiológicos confirmaram a presença de *Staphylococcus aureus* e a existência de leveduras, favorecendo a propagação da doença nos rebanhos. O produto aplicado em três doses sucessivas reduziu a infecção em 75,2% dos animais medicados. Os percentuais de lactose e o volume de produção se elevaram com a redução da infecção, enquanto os de proteína e gordura mantiveram-se estáveis. O uso deste novo produto constitui um novo conceito de tratamento para reduzir a incidência e prevalência da mastite, sem incrementar os processos de resistência bacteriana aos antibióticos mais usuais na clínica veterinária.

Palavras chave: mastite bovina, P22-P32, tratamento e controle.

<sup>1,2</sup> Universidade Federal do Paraná, <sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná e FEPAR.

## **INTRODUÇÃO**

A mastite é definida como uma reação inflamatória (FIGUEIREDO *et al.*, 1995) da glândula mamária e pode ser classificada em infecciosa, traumática e tóxica (IDF 1987 e ANDERSON *et al.*, 2006) e reduzem a produção leiteira e provocam mudanças na sua composição (COMPTON *et al.*, 2007, a e b). Existe nas formas clínicas e subclínicas (BRAMLEY *et al.*, 1996). Microrganismos Gram positivos e Gram negativos (FERREIRO *et al.*, 1981) invadem a glândula mamária aumentando o número de Células Somáticas no leite (BURVENICH *et al.* 1995 e DETILIEUX, 2004) e influenciam o estado infeccioso do úbere (RENEAUX, 1986, HARMON 1994).

Os métodos de diagnóstico (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1987 e 1991; FERNANDES, 2006) das mastites subclínicas incluem exames microbiológicos, *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM & NOORLANDER, 1957) e a contagem de células somáticas (CCS) (PHILPOT & NICKERSON, 1991, GALIERO & MORENA, 2000).

Em adição o uso de antibióticos para reduzir e controlar a mastite tem provocado processos de resistência nos microrganismos causadores da doença. Moléculas naturais produzidas por microrganismos podem ser utilizadas na elaboração de preparações antimastíticas (FITZGERALD *et al.*, 2000). A atividade destas moléculas não está esclarecida atualmente, mas são grande promessas no combate às infecções do úbere, podendo reduzir o período de descarte de leite, com grande importância em saúde pública.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Identificação e tratamento dos casos de mastite**

Selecionou fazendas e matrizes pelo nível tecnológico, produção leiteira, e padrão genético, controle da produção leiteira, exames clínicos (assimetria, consistência do úbere), e uso de vários antibióticos. Formaram-se dois grupos de vacas: grupo medicado com P22-P32 e grupo controle, aplicando-se placebo. Analisou-se o cheiro e os aspectos físico-químicos do leite, *California Mastitis Test* (CMT) e exames laboratoriais como pH, densidade e viscosidade. A preparação antimastítica foi acondicionada em seringas plásticas contendo respectivamente 500 mg e 250 mg de P22-P32 dissolvidos em 10,0 mL de veículo. O tratamento recomendado foi de uma aplicação intramamária diária, durante três dias.

### **Isolamento, identificação e caracterização microbiológica**

As contagens bacterianas foram realizadas no Laboratório da APCBRH. As provas de Kirby-Bauer foram realizadas para Amoxicilina, penicilina, gentamicina, cefalexina, lincomicina, eritromicina, cefoxitina e oxacilina.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o *National Clinical Laboratory Standard Institute* (NCCLS) e os sais de antibióticos usados foram da marca *Sigma-Aldrich Products*, USA.

As amostras de leite foram colhidas antes da aplicação e repetidas aos 8, 20, 30 e 180 dias após o tratamento para realizar as culturas microbianas em meios de Baird-Parker e PDA. Outros aspectos foram verificados por meio de testes bioquímicos e coloração de Gram. As análises estatísticas foram médias, desvio padrão e log.

### **Análise físico-químicas e CCS**

Foram realizadas no Laboratório da APCBRH. Níveis protéicos, de gordura e lactose foram determinados por meio de *Infrared Absorption Lecture* em

equipamento *Bentley 2000* e a CCS em um *Somacount 300* por fluxometria citométrica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento de agentes patogênicos do úbere e sua resistência a antibióticos.

Houve ocorrência de 53,9% de *Staphylococcus aureus*, responsáveis por processos crônicos de mastite. Igualmente a presença de leveduras em 40,8% das culturas, (*Candida spp.*) sugerem importante associação entre bactérias e leveduras. Contudo, atribuímos a presença de leveduras a um aumento da aderência ao úbere. (HENSEN *et al.*, 2000). Os resultados microbiológicos encontrados corroboram com outras pesquisas (GONÇALVES & KOZICKI, 1997; GONÇALVES *et al.*, 2001).

HENSEN *et al.*, (2000), relatam o encapsulamento do *S. aureus* no úbere como proteção aos antibióticos. Assim, é necessária uma nova e revulsiva terapia para reduzir a incidência da infecção nos rebanhos. Em adição a resistência a antibióticos não permitem a cura do processo mastítico. A resistência encontrada nos *S. aureus* envolve betalactâmicos, cefens, aminoglicosídeos, lincosamidas e macrolídeos. A maioria das linhagens foi resistente à penicilina e seus derivados (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

### Efeitos do P22-P32 observados no úbere

O uso destes produtos eliminou áreas de encapsulamento dos patógenos. Tecidos necrosados e exudatos procedentes dos processos inflamatórios estavam presentes no leite duas horas após a aplicação do medicamento, persistindo até 12 horas.

### Redução da Mastite Infeciosa Bovina (MIB)

O nível de CCS do grupo medicado decresceu em 75,2% dos casos (3.806 para  $388 \pm 1424$  CCS (x 1000)/mL). Em comparação com o grupo controle este estacionou em 646 to  $550 \pm 564$  CCS (x 1000)/mL, como na fig 2.

Dos casos medicados, 72,0% tiveram redução abaixo de 240 CCS (x 1000)/mL, e significante diminuição do quadro clínico.

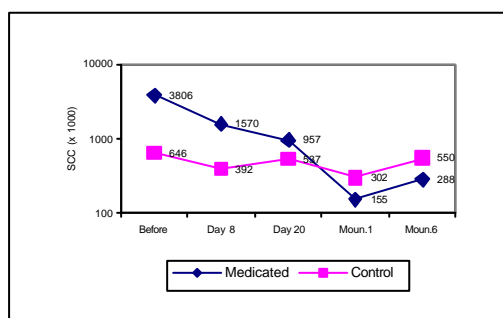


Fig. 2 Níveis de CCS (x 1000) em animais medicados e controles antes do tratamento, aos 8, 20, 30 e 180 dias após a medicação,  $p < 0,01$  (n= 152).

### Período de descarte do leite.

Estudos sobre o retorno a produção foi realizado por meio de espectrofotometria e *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e os resultados são apresentados na fig 3:

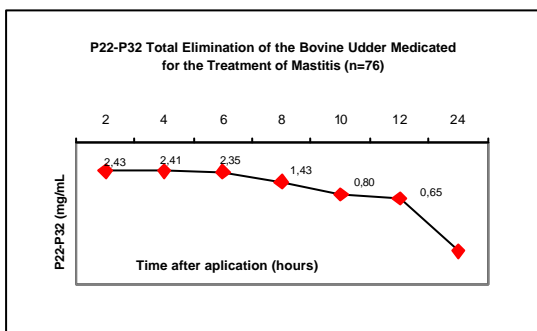


Fig 3. Tempo em horas para a eliminação do P22-P32 do úbere, após a medicação para tratamento da mastite.

Depois da 3ª dose foram necessárias 24 horas para total eliminação de resíduos do princípio ativo, observadas em provas de lacto-fermentação e as normas da ANVISA permitem o consumo no leite “*in natura*”.

### Manutenção dos níveis de Proteína e Gordura, e aumento dos níveis de Lactose.

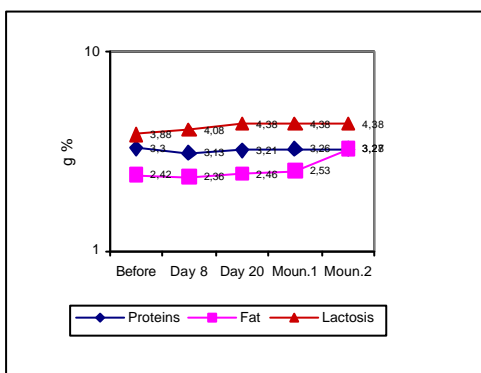


Fig. 4 Proteínas, Gordura e Lactose (g %) nos grupos medicados e controle, antes do tratamento, aos 8, 20, 30 e 180 dias após a medicação,  $p < 0,01$  (n= 76).

Os níveis de lactose e proteínas mostraram pequenas variações, como observado na figura 4, embora não significantes, as diferenças observadas após os 30 dias tiveram aumento de 5,70%. Finalmente, durante os 180 dias de experimentos houve aumento na produção leiteira de 8,60%. As médias de produção passaram de 28,71 L/vaca para 31,18L.

## CONCLUSÕES

Os produtos nas dosagens utilizadas neste trabalho permitem o uso precoce de leite fluído e a sua industrialização. Os resultados evidenciam estabilidade nos níveis protéicos e de gordura, e aumento dos níveis de lactose e de produção. Houve melhoria da qualidade do leite para a indústria o que permite maiores rendimentos e melhoria da saúde pública. Por outro lado, P22-P32 foi eficiente, reduzindo as CCS, a aderência de microorganismos ao úbere, com um menor descarte do leite, em relação aos antibióticos usuais. Contudo, um eventual aparecimento de resistência microbiana aos princípios ativos, serão menos importantes do que aqueles ocorridos com antibióticos usuais na clínica veterinária e humana.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), a Fazenda Santa Cecília e a Cooperativa de Laticínios São José pelas suas colaborações a este trabalho. Agradecem ao Departamento de Biotecnologia e Bioprocessos da UFPR, pelo suporte material.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, K.L. E LIMAN, R.L. (2006). Long -Term Persistence of Specific Genetic Types of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* on Three Dairies. *J. Dairy Sci.* n. 89, p. 4551-4556.
- BRAMLEY, A. J., CULLOR, J. S., ERSKINE, R. J., FOX, I. K., HARMON, R. J., HOGAN, J. S., NICKERSON, S. C., OLIVER, S. P., SMITH, K. L. & SORDILLO, I. M. (1996). Current concepts of bovine mastitis. *National Mastitis Council*, Madison, p. 1-3.
- BURVENICH, C., Guidry A. J. & PAAPE, M. J. (1995). Natural defense mechanisms of the lactating and dry mammary gland. *Proc. IDF Int. Mastitis Seminar*, Tel Aviv, p. 1.3-1.13.
- COMPTON, C.W.R., HEUER, C., PARKER, K., McDOUGALL, S. (2007) Risk Factors for Peripartum Mastitis in Pasture-Grazed Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.*, n. 90, p. 4171-4180. (a)
- COMPTON, C. W.R. HEUER, C., PARKER, K., McDOUGALL, S. (2007) Epidemiology of Mastitis in Pasture-Grazed Peripartum Dairy Heifers and Its Effects on Productivity. *J. Dairy. Sci.* n. 90, p. 4661-4669 (b).
- DETILLEUX, J. C. (2004) Neutrophils in the War Against *Staphylococcus aureus*: Predator-Prey Models to the Rescue. *J. Dairy Sci.* n. 87, p. 3716-3724.
- FERNANDES, D. Vaca seca: Onde começa o lucro com leite. Atualização Técnica 37, Div. Agropec. Pfizer, 2006. Disponível em [www.pfizersaudeanimal.com.br/bov\\_atualizações](http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações) 5. asp. Acesso em 25/09/2006.
- FERREIRO, L.; CLEMENTE DOS SANTOS, E.; DA SILVA, N. Occurrence and Etiology of Bovine Mastitis in the "Zona da Mata" Region of Minas Gerais State, Brazil. *Arq. Esc. Vet.*, v.33, n.1, p.31-37,1981.
- FIGUEIREDO, J. B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. Belo Horizonte. Anais. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, XI, p.176-94, 1995.
- FITZGERALD, J. R.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMITH, C. J. Molecular population and virulence analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J. of Appl. Microbiol.*, n.88, p.1028-1037, 2000.
- GALIERO, G., MORENA, C. (2000) The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. *Bubalus bubalis*, n. 4, p. 26-27.
- GONÇALVES, D & KOZICKI, L. E. (1997) Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows with and without placental retention. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* v. 34, n.6. p. 364-370.
- GONÇALVES, D; KOZEMJAKIN, A. D; BACILA, M; OLIVEIRA, B. H; BAGGIO, J. V. N; FERREIRA, A. J. M; AANDRADE, U. V. C; BRANDALISE, F. Uso intramamário de clorhexidina em bovinos. *Rev. Inst. Latic.* "Cândido Tostes"v. 54, n. 311, p. 3 - 8, 1999.
- HARMON, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Res.* 77: 2103-2112.
- HENSEN, S.M., PAVIC, J. A. M.P., LOHUIS, J.A.C.M., POUTRELI, B. Use of Bovine Primary Mammary Epithelial Cells for the Comparison of Adherence and Invasion Ability of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Dairy Sci* 83:418–429, 2000.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1987). Bovine mastitis: definition and guidelines for diagnosis. *IDF Bulletin* 211. 24p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1991). Milk. Enumeration of somatic cells. *IDF Standard 148*. 8p.

PHILPOT, W. N. & NICKERSON, S. C. (1991). Mastitis: counter attack. Babson Bros, Naperville. 150p.

RENEAU, J. K. (1986). Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.* 69: 1708-1720.

ROSSI, F., ANDERAZZI, D.B. Resistência Bacteriana. Interpretando o antibiograma. Ed Ateneu. São Paulo, 2005, 188p.

SCHALM, O. W. & NOORLANDER, D. D. (1957). Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130:199-204.