

## COMPARAÇÃO DO ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO DE GLÂNDULA MAMÁRIA E DO LEITE DE CAPRINOS TUBERCULINA POSITIVA.

FRANCA, A.P.<sup>1\*</sup>; MELVILLE, P.A.<sup>2</sup>; PINHEIRO, S.R.<sup>3</sup>; VASCONCELLOS<sup>4</sup>, S.A.; ROSÁRIO, T.R.<sup>5</sup>; ALMEIDA, L. B. A.<sup>5</sup>, ALMEIDA, C.<sup>6</sup>; BENITES, N.R.<sup>3</sup>.

**Resumo:** Até recentemente acreditava-se que a tuberculose em caprinos fosse uma enfermidade rara, o que levou ao errôneo conceito de que esses animais fossem resistentes ao *Mycobacterium bovis*. Pesquisas recentes comprovaram uma maior resistência desses animais ao *M.tuberculosis*, apresentando maior susceptibilidade ao *M. bovis*, sendo o agente classificado como *Mycobacterium bovis subsp. caprae*, também pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A correlação entre os resultados Califórnia Mastitis Test (CMT), o Tamis e os isolados bacteriológicos cultura positiva e negativa do leite e da glândula mamária de cabras produtoras de leite com diagnóstico positivo ao teste de tuberculina, foi realizado em 49 animais necropsiados. perfazendo um total de 98 amostras de leite e da glândula mamária. Os dados foram obtidos através do isolamento e identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus spp* e *Corynebacterium spp* identificadas do leite, e *Staphylococcus spp* cultura positiva no parênquima mamário, juntamente com os resultados encontrados no teste de Tamis positiva e negativa, e CMT negativo, duas cruzes e três cruzes relacionados ao isolamento microbiológico da glândula e do leite. Através desta pesquisa pode-se verificar que não ocorreu relação entre os resultados microbiológicos obtidos do parênquima da glândula mamária, e do leite coletado nas glândulas CMT positiva e observou-se freqüência de isolamento de microrganismo semelhante entre o material coletado da glândula mamária e do leite das amostras CMT negativo. Para o teste de Tamis positivo e negativo, não houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) pode-se concluir que tanto no leite quanto no parênquima da

1

<sup>1\*</sup> Médica Veterinária-Mestranda (bolsista FAPESP)/Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal.

<sup>2</sup> Médica Veterinária Responsável pelo Laboratório de Doenças Infecciosas com doutorado em microbiologia-Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/ Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

<sup>3</sup> Professor Doutor Associado- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/ Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

<sup>4</sup> Professor Doutor Titular- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/ Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

<sup>5</sup> Médica Veterinária-Doutoranda (bolsista CAPES)/ Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal.

<sup>6</sup> Médico Veterinário-Mestrando (bolsista FAPESP)/Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal.

•auxílio financeiro-FAPESP

•Laboratório de Doenças Infecciosas (Bacteriologia e Micologia) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

5

3

glândula mamária a freqüência de isolamento são iguais. Quando comparou-se a porcentagem de freqüência de isolamento de microrganismos no leite com o da glândula obteve-se um  $P < 0,001$ , o que deixa claro que a freqüência de isolamento no leite foi muito superior a freqüência de isolamento de microrganismos no parênquima.

## Introdução

As zoonoses são enfermidades que representam uma ameaça importante para a saúde humana e animal em todo o mundo. São naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e o homem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967). Apesar da adoção de medidas de controle de enfermidades e da ampla cobertura dos serviços de saúde, estas zoonoses continuam registrando elevadas taxas de ocorrência em zonas rurais e urbanas em diversos países. São prevalentes em numerosas espécies animais das quais o homem se alimenta. Estas doenças podem apresentar um grande impacto econômico em países onde a exportação assegura a estabilidade econômica a qual depende diretamente da confiabilidade de alimentos livres de enfermidades. Desse modo, as enfermidades zoonóticas apresentam estreita relação entre a saúde pública, ambiente e o bem estar sócio-econômico (ACHA & SZFRES).

A tuberculose é uma dessas zoonoses, destacando-se como enfermidade de distribuição mundial, sendo a principal causa a morte provocada por um único agente. É causada pelo *Mycobacterium bovis*, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento. É considerada uma epidemia lenta que ressurgiu nos dias de hoje como uma emergência global.

A tuberculose caprina pode ter sido considerada rara a essas espécies (GUTIÉRREZ et al., 1995; LUKE, 1958, MURRAY et al., 1921; SOLIMAN et al. 1953), pois pesquisas recentes mostraram que são suscetíveis ao *Mycobacterium bovis* (THOEN, 1988; BERNABÉ et al., 1991, MORRIS et al., 1994), mas frente a resistência ao *Mycobacterium tuberculosis* (GRIFFITH et al., 1930; O' REILLY & DABORN, 1995). Atualmente esse agente foi classificado em uma subespécie de *M.bovis*, para a espécie caprina, sendo denominado de *Mycobacterium subsp. caprae*, também pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* ( ARANAZ et al., 2003). A infecção por esse agente na espécie em questão pode ocorrer por contato direto com o animal doente, ou por alimento contaminado, e causar doença progressiva e generalizada.

A caprinocultura é uma atividade que vêm se desenvolvendo muito nos últimos anos. O Brasil apresenta o 9º rebanho de caprinos do mundo, sendo que o país que apresenta o maior rebanho é a Índia. A cabra como animal leiteiro continua ocupando um espaço importante no mundo moderno, inclusive em países com a bovinocultura adiantada, pelas vantagens que a espécie apresenta no tocante à sua grande eficiência de produção, aliada ao valor nutricional de seu leite como alimento para crianças, velhos enfermos, pessoas alérgicas ao leite de vaca e para o fabrico de produtos destinados ao consumidor de maior poder aquisitivo (ZACHARIAS, 2001). Segundo ZACHARIAS (2001), cerca de 10% do leite consumido no mundo é de origem caprina, sendo que em alguns países ele representa a única fonte láctea disponível.

## Objetivos

Tendo em vista a importância da caprinocultura na produção de leite, esta pesquisa teve por objetivo avaliar e estudar a frequência dos microrganismos isolados da glândula mamária e do leite de cabras tuberculina positiva, analisados juntamente com os testes de CMT (Califórnia Mastitis Test), e Tamis.

## Material e Métodos

Os animais utilizados para essa pesquisa foram diagnosticados segundo o teste de tuberculinização intradérmica cervical comparativa no pescoço. Os resultados ao teste de tuberculinização com *M.avium* e *M.bovis* lidos 72 horas pós-sensibilização foram positivos quando o aumento da espessura da dobra da pele induzida pela tuberculina bovina foi superior a reação aviária em pelo menos 2,5mm; inconclusiva quando a diferença entre elas ficou situada entre 1,9 e 2,4mm; e negativa quando a reação bovina ultrapassou a aviária em até 1,8mm, como é recomendado por SILVA et al. (2006).

Os animais positivos foram separados do restante do rebanho e submetidos a exames clínicos minuciosos. As fêmeas tiveram os seus úberes examinados detalhadamente, onde procurou-se observar clinicamente o parênquima da glândula e o leite de cada uma. Foi coletado o leite de cada animal onde os primeiros jatos foram submetidos ao teste de caneca de fundo escuro e após este ao CMT (California Mastitis Test). Segundo SILVA et al (2001), o CMT deve ser utilizado como teste de triagem da saúde da glândula mamária caprina, associado ao exame microbiológico do leite. O teste CMT foi realizado seguindo os procedimentos descritos por Schalm e Noorlander (1957) e para a interpretação dos resultados foi atribuído o mesmo critério descrito para bovinos. O leite coletado foi colocado em tubos estéreis e acondicionado sob refrigeração, após serem realizados os testes de Tamis e CMT.

As cabras depois de terem sido examinadas clinicamente como já foi citado anteriormente, foram designados ao abate sanitário. De um total de 80 animais positivos, apenas 49 foram necropsiados buscando-se lesões macroscópicas que condissessem com a tuberculose. O úbere de cada animal foi examinado separando-se a glândula direita da esquerda, e observando-se o parênquima mamário de cada glândula. Durante o exame da glândula pode-se notar 3 glândulas com lesões macroscópicas típicas de tuberculose. Das cabras submetidas à necropsia encontrou-se lesões macroscópicas também no pulmão e fígado, sendo que algumas apresentaram aderência diafragmática. Coletou-se três fragmentos do parênquima da glândula mamária, sendo um fragmento com aproximadamente 1,0 cm e dois fragmentos com aproximadamente 2,0 cm cada um. O primeiro pedaço de tecido mamário de 1,0 cm foi coletado da forma mais asséptica possível, colocada em tubo estéril, acondicionado sob refrigeração. Os outros pedaços de tecido mamário de 2,0 cm foram colocados em recipiente apropriado contendo formol a 10%. O fragmento da glândula com cerca de 1,0 cm mantido sob refrigeração, foi mergulhado no álcool 96° G e flambado três vezes. Posteriormente colocado no graal com areia e salina estéril, onde foi macerado com o pistilo, após feito esse processo, colocou-se com alça estéril descartável o conteúdo obtido do macerado, semeando-se em caldo de infusão cérebro-coração

(caldo BHI), em meio Ágar sangue de carneiro e Ágar Sabouraud-dextrose. O material semeado em BHI, Ágar sangue e Ágar Sabouraud-dextrose foi incubado a 37°C por um período de 24 horas. A leitura dos meios Ágar sangue e Ágar Sabouraud-dextrose realizou-se as 24, 48, e 72 horas visando à observação do crescimento, isolamento e identificação dos microrganismos isolados nos meios. O fragmento da glândula já macerado, foi descontaminado segundo a técnica de Petroff (CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1988) e semeado nos meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen, sendo observados semanalmente por um período de 90 dias

O leite coletado mantido sob refrigeração foi semeado em meio de Ágar Sangue de carneiro (ágar base acrescido de 7% de sangue de carneiro) e Ágar Sabouraud-dextrose para se observar as possíveis bactérias que poderiam crescer e também objetivando descartar a possibilidade do crescimento de *Corynebacterium*. As mastites causadas por estes microrganismos representam um relevante problema econômico por determinar acentuada redução na produção leiteira da glândula mamária afetada (NATZKE et al, 1972), por tanto fez-se diagnóstico diferencial do *Mycobacterium spp* de *Corynebacterium spp*. O leite semeado nos meios citados a cima, foi incubado a 37°C em aerobiose por 24, 48 e 72 horas, fazendo-se a leitura das placas de petri com o material semeado nos três tempos com a finalidade de isolar, identificar e classificar os microrganismos detectados no leite que não sejam micobacterias.

## Resultados e Discussões

Os resultados encontrados no teste de Tamis foram comparados entre os animais que apresentaram Tamis positivo com isolamento bacteriológico positivo e negativo, juntamente com Tamis negativo onde se obteve isolamento bacteriológico positivo e isolamento negativo. De um total de 98 amostras de leite foi observado ao teste positivo de Tamis um isolamento bacteriológico de 15 (53,57%) amostras positivas a cultura e 13 (47,43%) negativas. Já quando o teste da caneca de fundo escuro apresentou-se negativo, obteve-se um resultado de 34 (48,57%) culturas positivas e 36 (51,43%) culturas negativas. Comparou-se os resultados obtidos no parênquima da glândula mamária que apresentaram Tamis positivo e negativo, com a presença de cultura positiva e negativa, das 98 amostras de parênquima que foram cultivadas e apresentaram-se positivas ou não ao cultivo. Os resultados encontrados foram: Tamis positivo 2 (7,14%) culturas positivas e 26 (92,86%) negativas, para o Tamis negativo encontrou-se 2 (92,86%) culturas positivas e 68 (97,14%) negativas. Como não houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) pode-se concluir que para o Tamis positivo e negativo tanto no leite quanto no parênquima da glândula mamária a frequência de isolamento são iguais. Quando comparou-se a porcentagem de frequência de isolamento de microrganismos no leite com o da glândula obteve-se 50% de isolamento do leite e 4,08% no parênquima ( $P < 0,0001$ ), o que deixa claro que a frequência de isolamento no leite foi muito superior a frequência de isolamento de microrganismos no parênquima.

O mesmo padrão de análise foi realizado para teste CMT em relação ao isolamento de cultura positiva e negativa no leite e no parênquima da glândula de cabras tuberculina positiva. Os resultados apresentados foram: para o CMT

negativo de um total de 98 amostras de leite, achou-se 7(21,9%) de isolados bacteriológicos positivos e 25(78,1%) de negativos. Já no parênquima para o mesmo número de amostras desse tecido, verificou-se 2(6,25%) cultura positiva 30(93,75%) negativas. As porcentagens citadas anteriormente apresentaram um  $P < 0,0001$ , tanto para o leite quanto para a glândula. Conclui-se que a frequência de isolamento de microrganismos com cultura negativa foi maior que a frequência de isolamentos positivos no tecido mamário e no leite. No CMT duas cruces, para o mesmo número de amostras, no leite e no parênquima, encontrou-se no leite um isolamento bacteriano de cultivo positivo de 42(65,63%) e um isolamento bacteriano negativo de 22(34,37%). A diferença estatística verificada quando compara-se os resultados dos isolados de cultura positiva para negativa foi significativa, obtendo-se nesta análise um  $P < 0,007$ . Quando fez-se a mesma análise para o parênquima mamário em relação ao isolamento de microrganismos positivos e negativos na cultura verificou-se os seguintes dados: 2(3,13%) de isolados positivos e 62(96,87%) de isolados cultivados foram negativos. Deduz-se que os dados supra citados, para cultura positiva e negativa no parênquima, apresentaram um  $P < 0,0001$ , sendo que a frequência achada para a cultura positiva e negativa da glândula não bate com o que encontrou-se no leite. Em relação aos resultados apresentados pelo CMT três cruces, observou-se os seguintes aspectos: tanto no leite como no fragmento da glândula, do total das amostras semeadas em meio adequado, pode-se notar apenas 2(100%) de resultados sem crescimento bacteriano. Deve-se destacar que para CMT traços e uma cruz os animais não apresentaram resultados frente a este teste, por tanto não se obteve isolamento nem do leite e nem da glândula.

Das amostras de leite submetidas ao exame microbiológico 50(51,02%) foram negativas e 48(48,98%) das amostras positivas foram isolados os seguintes agentes: 47(97,92%) de *Staphylococcus spp* e 1(2,10%) de *Corynebacterium spp*.

Das 98 amostras do parênquima mamário examinadas onde se realizou exame microbiológico, 94(5,92%) apresentou-se negativas e 4(4,08%) mostrou-se positivas, das amostras positivas foram isolados no meio de cultura 4(100%) *Staphylococcus spp*. Cabe aqui salientar que das amostra de glângula mamária semeadas nos meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen, apenas um tubo nostrou-se positivo para o primeiro. apresentando uma porcentagem de 1,02%. Dessa forma constatou-se presença de *Mycobacterium bovis*, uma vez que o meio de Stonbrink é comumente utilizado para isolar e tipificar esse microrganismo. Pode-se concluir por tanto, que em caprinos a incidência de lesões por *Mycobacterium* na glândula mamária ocorre, porém é de frequência baixa. Pelos dados estabelecidos pelo estudo em questão, não pode-se verificar relação entre os resultados microbiológicos obtidos do parênquima da glândula mamária, e do leite coletado nas glândulas CMT positiva e observou-se frequência de isolamento de microrganismo semelhante entre o material coletado da glândula mamária e do leite das amostras CMT negativo.

## Referências

ACHA, P.N., SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermidades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales**. 2ªed.Washintogton, E.U.A.; Organización Panamericana de la Saud, 1984. p. 174-185.

ARANAZ, A.; COUSINS, D. ; MATEOS, A. ; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp.caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb.nov., sp. nov. *int. J. Syst Evol. Microbiol* 2003; **53**: 1785-9.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V.; VERA,A.; SIERRA, M.A. Morphopathology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary Tuberculosis. **Annales de Veterinaria Murcia**, v.6/7, p. 9-20, 1990-1991a.

GRIFFITH, A.S.; TYTLER, W.H. Bacillus tuberculosis. In: **MEDICAL RESERCH COUNCIL**. A system of bacteriology in relation to medicine. London, His Majesty's Stationary Office, 1930. p. 151-305.

CENTRO PANAMERICANO. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1988.(Publicacion especial, 8).

GUTIÉRREZ, M. et al. Differentiation bymolecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and gotas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.11, p.2953-2956, 1995.

LUKE, D. Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. **Veterinary Record**, v.70, n.26, p.529-536, 1958.

MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.*, **40**:153-177,1994.

MURRAY, C.et al.Tuberculosisof goats**Journal of American Veterinary Medical Association**, v.59, p.82-84, 1921.

NATZKE, R.P.; EVERETT, R.W. GUTHERIE, R.S.; DEOWN, J.F.; MEEK, A.M.; MERRILL, W.G.; ROLET, S.J.; SCHMIDT, G.H. mastitis Control program: effect on milk production. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.1256-60, 1972.

O ' REILLY, L.M.& DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and mam: a review. *Tuber. Lung Dis.*, 76(Supplement 1): 1-46, 1995.

SCHALM, A. W.; NOORLANDER, D.O. Experiments na dobsservations leading to developementes and California Mastitis Test. **Journal of the Americam Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199-207, 1957.

SILVA, P.E.G.; PINHEIRO, S.R.; LEAL, M.L.R.; BERTAGNON, H.G.B.; MOTTA,, P.M.P.C.; SENHORINI,I.L.; VASCONCELLOS,S.A. Teste de tuberculose em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. **Ciências Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.880-886, mai-jun, 2006.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SAUKAS, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SOLIMAN, K.N. et al. An outbreak of naturally acquired tuberculosis in goats. *Veterinary record*, v.65, n.27, p.421-425, 1953.

THOEN, C.B. Tuberculosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.193, n. 9, p. 1045-1048,1988

WORLD HEALTH ORGANIZATION, JOINT FAO/WHO. Expert. Committeon Zoonoses. Third report Geneva, 1967 p. 127 (Technical Report. Séries, (378).

ZACHARIAS, F. Caprinocultura leiteira–**Mercado e orientações de manejo**. Salvador : EBDA, 2001. 80p. (EBDA, Documentos, 13).