

EFEITOS DA APLICAÇÃO INTRA-MAMÁRIA NO TRATAMENTO DE MASTITE EM BOVINOS UTILIZANDO A OZONIOTERAPIA.

Livia Helena Moreira*, Adriana B. F. Moretti*, Carlos J. Lima*, Dora Inês Kozusny-Andreani*, Renato Amaro Zângaro*, Zullyt Zamora Rodriguez**.

*Instituto de Engenharia Biomédica, Unicastelo, Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500 Distrito Eugênio de Melo, São José dos Campos, CEP: 12247- 016 e Associação Cidade da Ciência Tecnologia e Educação – CITÉ, Rua Machado Sidney, 160/601, Centro - CEP 12245-650, São José dos Campos – SP, Brasil.

**Centro Nacional de Investigaciones Cientificas (CNIC) e Centro de Investigaciones del Ozone, Calle 230 esq., 15, Siboney, Playa, Ciudad del Habana, Cuba, CEP 6412-6414.

e-mail:lhsil@uol.com.br

Resumo: A mastite bovina na forma subclínica é encontrada em maior frequência nos rebanhos do Brasil. O objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis alterações no leite de vacas tratadas para mastite subclínica utilizando a ozonioterapia intramamária. O experimento foi realizado em vacas (n=6) lactantes todas com mastite subclínica, no qual 20 tetos foram utilizados (n=20) no experimento, 14 tetos foram tratados com a mistura gasosa O₂/O₃ e 6 tetos não receberam o tratamento, denominado grupo controle. O gerador de ozônio foi acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal para a produção da mistura gasosa O₃/O₂, o tratamento consistiu em uma única aplicação através do esfíncter do teto por sonda uretral, na concentração de 10mg/mL, no volume de 720 mL por teto. Amostras de leite foram colhidas nos momentos antes, 24 e 48h após o tratamento, e enviados ao laboratório para as análises microbiológicas, composição do leite, contagem células somáticas e contagem bacteriana total. Houve uma redução na Contagem Bacteriana Total dos tetos tratados no período de 48h coincidindo com a redução nos isolamentos microbianos para *Corynebacterium bovis*, em relação a composição do leite e a contagem de células somáticas não foram observadas alterações após o tratamento.

Palavras-chave: mastite, contagem células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição do leite, Ozônio.

Abstract: Bovine subclinical mastitis is found more frequently in herds in Brazil. The objective study was to determine possible changes in the milk of cows treated for mastitis subclinical intramammary using ozone therapy. The experiment was performed in cows (n = 6) lactating all with subclinical mastitis in which 20 ceilings were used (n = 20) in the experiment, 14 ceilings were treated with O₂/O₃ gas mixture ceilings and 6 received no treatment, as the control group. The ozone generator was attached to a medical oxygen cylinder to produce the O₂/O₃ gas mixture, the treatment consisted of a single application through the urethral

*sphincter ceiling probe at a concentration of 10mg/ml in a volume of 720 mL ceiling. Milk samples were collected in the moments before, 24 and 48 h after treatment, and sent to the laboratory for microbiological analyzes, milk composition, somatic cell count and total bacterial count. There was a reduction in the Total Bacterial Count ceilings processed in 48h period coinciding with the reduction in microbial isolates for *Corynebacterium bovis* in relation to milk composition and somatic cell count no changes were observed after treatment.*

Keywords: mastitis, somatic cell count, total bacterial count, milk composition, ozone.

Introdução

A mastite bovina é uma doença que tem sido estudada desde o século XVIII e, mesmo na atualidade, com muitos estudos sobre a patologia, ainda é a doença de maior impacto econômico na produção leiteira. Apresenta alta prevalência nos rebanhos do mundo inteiro e estimam-se perdas anuais de aproximadamente 35 bilhões de dólares [1]. Ao se pensar em tratamento para mastite subclínica deve sempre ser levado em consideração o custo, o tempo de eliminação dos medicamentos e a perda de leite. Assim, recomenda-se o menor número de aplicações visando à cura dos animais e o rápido retorno da produção normal do leite [2].

Novas alternativas estão sendo pesquisadas para o tratamento da mastite, tais como, homeopatia nos animais criados sob o regime orgânico [3], a terapia fotodinâmica em mastite subclínica [2] e o uso do ozônio no tratamento desta infecção [4,5]. A ozonioterapia é uma forma de tratamento que mistura oxigênio-ozônio mediante a passagem de oxigênio puro por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência, tratamento realizado por um equipamento eletromedicina que produz um gás com diferentes concentrações de ozônio [6]. Ao penetrar no organismo, o ozônio melhora a oxigenação consequentemente o metabolismo, contribuindo para a eliminação de

produtos tóxicos provenientes do metabolismo celular e regulação dos mecanismos de defesa imunológica, atuando como imunomodulador [7]. O poder oxidante do ozônio é superior ao do oxigênio, uma vez que estimula diferentes sistemas enzimáticos protetores do organismo [8].

A molécula O_3 apresenta ação fungicida, viricida e bactericida e pode ser usada no tratamento de diversas enfermidades [9]. Os efeitos bactericidas ocorrem pela interrupção da integridade dos fosfolípidios e lipoproteínas da membrana citoplasmática e da parede celular das bactérias, as bactérias Gram negativas são mais sensíveis ao ozônio devido a peroxidação desses compostos das membranas. O efeito viricida é devido aos danos da região do capsídeo que é estruturado por fosfolípidios e glicoproteínas, mas a sensibilidade do vírus é variável. O mecanismo fungicida ainda não é muito bem compreendido, entretanto já foi comprovado o seu efeito inibitório do ozônio nesses micro-organismos [10].

O objetivo do presente estudo foi verificar possíveis alterações nas análises microbiológicas, composição do leite, contagem células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana Total (CBT) de vacas tratadas com a mistura gasosa O_2/O_3 em mastite subclínica através da via de aplicação intramamária.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado em vacas da raça Holandesa em uma propriedade localizada em Caçapava/SP. Foram utilizados seis animais ($n=6$) todos com mastite subclínica, totalizando 20 tetos ($n=20$ tetos) utilizados no experimento, 14 tetos foram tratados com o ozônio e seis tetos não foram tratados, um teto por animal, servindo como grupo controle.

A ocorrência de mastite subclínica foi pesquisada pelo teste Califórnia Mastitis Test (CMT), realizado uma vez por semana, na primeira ordenha do dia em todas as vacas em lactação antes de serem ordenhadas. As fêmeas que apresentaram positividade de três cruces (+++) em quatro exames seguidos ao CMT foram, então, selecionadas para o experimento. Após a seleção dos animais, antes da primeira ordenha do dia, os tetos foram lavados com água, secos com papel toalha e higienizados com álcool a 70% em seguida foram colhidas amostras de leite para a análises microbianas, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), por citometria de fluxo, e composição do leite nos momentos antes (0), 24h e 48h após o tratamento.

As amostras de leite eram armazenadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e enviadas aos laboratórios para as análises. Em seguida, executou-se a ordenha normalmente e ao seu término iniciou o tratamento com o ozônio.

O gerador de ozônio utilizado foi o modelo O & L 1.5RM da marca Ozone & Life que foi acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal para a produção da mistura gasosa O_2/O_3 . O tratamento consistiu em aplicar

a mistura gasosa O_2/O_3 através do esfíncter do teto por sonda uretral de nº08 introduzindo um volume de 720 mL no interior da cisterna da glândula, através de seringas de 60 mL, utilizando a concentração de 10mg/mL, o tratamento se deu em dose única. Após o tratamento retirou-se a sonda uretral aplicou-se nos tetos o pós-dipping utilizado rotineiramente na fazenda e os animais foram soltos no piquete.

Com os resultados obtidos foram realizados tratamentos estatísticos através das análises comparativas de cada grupo. Foi utilizado o método estatístico ANOVA (análise de variância) com intervalo de confiança de 5%. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p<0,05$.

Trabalho submetido e aprovado pela CEUA/UNICASTELO sob o número: 1-00033/2012.

Resultados

Foram colhidos ao total 60 amostras de leite durante o período experimental e enviados ao laboratório, obtendo os resultados para as análises microbiológicas do leite mastítico conforme apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Percentual dos micro-organismos isolados nas amostras de leite mastítico antes do tratamento nos dois grupos.

Micro-organismos isolados	Controle	Tratamento
	%	%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	17	32
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	8	16
<i>Corynebacterium bovis</i>	33	32
<i>Actinomyces piogenes</i>	17	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	4
<i>Micrococcus lylae</i>	8	0

Com os resultados obtidos nas análises microbiológicas observamos uma redução microbiana no período de 24h após o tratamento intramamário do micro-organismo *Corynebacterium bovis* passando de 32% para 27% e depois para 22% no período de 48h, os demais micro-organismos não sofreram influência da mistura gasosa oxigênio/ozônio.

Em relação as análises por citometria de fluxo, a contagem bacteriana total e a contagem células somáticas estão apresentadas respectivamente nas figuras 1 e 2.

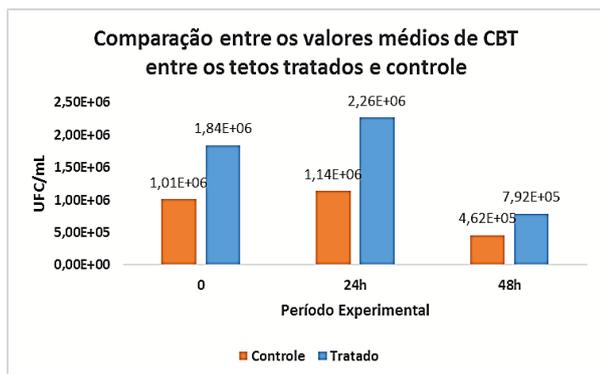


Figura 1: Comparação entre os valores médios da contagem bacteriana total (CBT), por citometria de fluxo, dos tetos tratados com ozônio e controle nos momentos zero (0), 24h e 48h

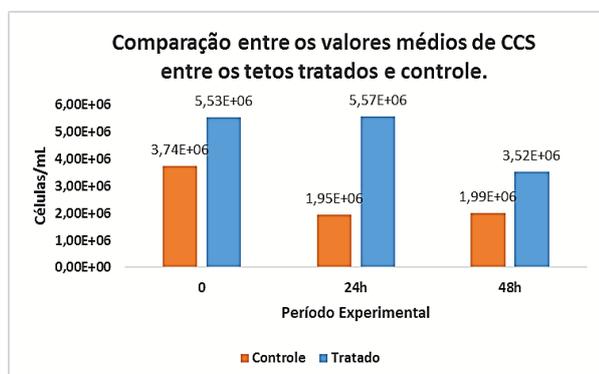


Figura 2: Comparação entre os valores médios da contagem células somáticas (CCS) dos tetos tratados com ozônio e controle nos momentos zero (0), 24h e 48h.

Após as análises dos resultados obtidos da CBT e CCS por citometria de fluxo, foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os grupos, tratamento e controle, com o intervalo de confiança de 5%. O tratamento com ozônio intramamário para a CBT por citometria de fluxo, foi o único que apresentou diferença significativa ($T_{calc} > T_{tab}$), $p < 0,05$, caracterizando que o tratamento foi eficiente na redução parcial dos micro-organismos envolvidos na contagem bacteriana total para mastite subclínica.

Não houve diferenças significativas ($T_{calc} < T_{tab}$ 5%, $p > 0,05\%$) entre as análises estudadas para a CCS nos intervalos antes, 24 e 48h após o tratamento dos tetos tratados com o ozônio e controle.

Em relação aos principais componentes da composição do leite foram obtidos os seguintes resultados para gordura, proteína, lactose, caseína, nos momentos antes (0), 24 e 48h após o tratamento entre os grupos, apresentados na figura 3.

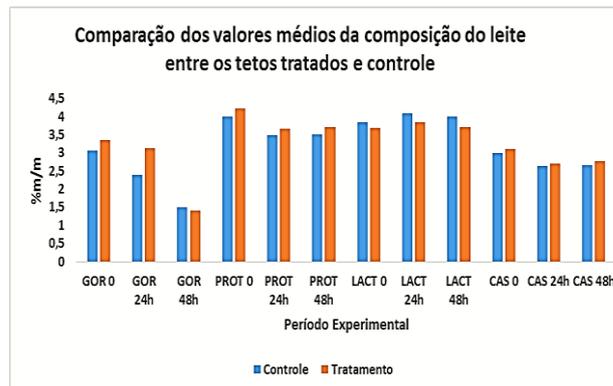


Figura 3: Comparação entre os valores médios dos tetos, tratados e controle, dos principais componentes da composição do leite. Legenda= GOR 0, 24h, 48h (teor de gordura nos momentos zero, 24h e 48h); PROT 0, 24h, 48h (teor de proteína nos momentos zero, 24h e 48h); LACT 0, 24h, 48h (Teores de lactose nos momentos zero, 24h e 48h); CAS 0, 24h, 48h (teores de caseína nos momentos zero, 24h e 48h).

Após as análises dos resultados obtidos na composição do leite foram realizados tratamentos estatísticos por ANOVA em todos os componentes estudados, com o intervalo de confiança de 5%. Observou-se pelas análises dos resultados obtidos que não houve diferenças significativas ($T_{calc} < T_{tab}$ 5%, $p > 0,05\%$) entre as análises estudadas nos intervalos antes, 24 e 48h após o tratamento dos tetos tratados com o ozônio e os tetos controle.

Discussão

Apesar de existir uma vasta literatura sobre as aplicações do ozônio, ainda há poucas publicações relacionadas com mastite em bovinos [4,5], e estas comprovam que dependendo do micro-organismo causador da mastite pode ser mais fácil ou não eliminá-los utilizando a ozonioterapia [5], dados também observados nesta pesquisa, onde apenas o micro-organismo *Corynebacterium bovis* foi parcialmente reduzido após o tratamento nos isolamentos microbianos e confirmado com a redução da contagem bacteriana total pela citometria de fluxo, os outros micro-organismos, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Actinomyces piogenes* e *Staphylococcus aureus*, podem não ter sofrido a influência do ozônio nesta dosagem utilizada, ou os tetos tratados poderiam ter sido recontaminados com os utensílios de ordenha e manuseio dos ordenadores, como relatado por outro autor [2], pois as colheitas das amostras de leite ocorreram com intervalo de 24h e os animais foram ordenhados de 12 em 12h podendo ocorrer esta recontaminação.

Com a utilização da ozonioterapia em mastite subclínica em vacas há relatos que o período de cura da doença poderia demorar até 30 dias para a redução da CCS [4], dados que corroboram em nossa pesquisa já

que a CCS não sofreu alteração mantendo-se elevada durante as 48h após o tratamento com a mistura gasosa O₂/O₃.

Não foram observados após o tratamento alterações nos principais componentes da composição do leite (gordura, proteína, lactose e caseína) nos momentos 24 e 48h, o que torna a técnica viável para o tratamento de mastites, pois é uma técnica de baixo custo, sem deixar resíduos no leite. A ozonioterapia é uma técnica promissora que requer mais estudos dentro da patologia.

Conclusão

A aplicação intramamária da mistura gasosa Oxigênio/Ozônio no tratamento de mastites subclínicas não alterou a composição do leite, manteve a quantidade de células somáticas, reduzindo parcialmente a contagem bacteriana total, com a redução microbiológica de *Corynebacterium bovis*. É uma técnica promissora por não deixar resíduos no leite e ser de baixo custo.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto para a execução da pesquisa de número 3096/2009 e pela bolsa de PNPB concedida de número 23038.001719/2012-88.

Referências

- [1] Wellenberg, G.J.; Poel, W.H.M.; Oirschot, J.T.. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, v.88, p.27-45, 2002.
- [2] Moreira, L.H. Tratamento de mastite Subclínica utilizando Terapia Fotodinâmica (PDT). 2009. 83f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- [3] Ruegg, P. L.. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal Animal Science*, v.87, n.13, p. 43-55, 2009.
- [4] Pereira, M.T.C.; Garcia, C.A. Eficácia da ozonioterapia no tratamento de mastite subclínica de vacas em lactação. *Veterinary Not.*, v.12, n.2, p.109-115, 2006.
- [5] Ogata, A.; Nagahata, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *J. Vet. Med. Science.*, v.62, n.7, p.681-686, 2000.
- [6] Haddad, M.A.; Souza, M.V.; Hincapie, J.J. et al. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.3, p.539-546, 2009.
- [7] Recio Del Pino, E., Serrano, M. A., Rodríguez Del Rio, M. Aspectos de La ozonoterapia en pacientes con neuropatía periférica epidérmica. *Rev. Cubana Enfermer.*, 15 (2): 114-118, 1999.
- [8] Diaz, A.B., García, M.M.; Pia, C.M.; Menéndez, S.C. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria em pacientes com enfermedades vasculares periféricas: informe preliminar (resumo). *Rev. Cuba Invest. Biomed.*, v. 20, n.1, p.42-44, 2001.
- [9] Sunnen, G. Ozone in medicine: overview and future directions. 2001. Disponível em: <<http://www.ozoneservice.com>>. Acessado em: 02 out. 2001.
- [10] Hernández, O.D.; González, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. *Rev. Cubana de Cir.*, v.40, n.2, p.123-129, 2001.