

Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAUJO, W.P.; COSTA, E.O.; GARCIA, M; TÁVORA, J.F.P.; BENATTI, L.A.T

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva -FMVZ-USP

RESUMO: Para se avaliar características físico-químicas e microbiológicas de leite com alta contagem de células somáticas (de glândulas sem alterações ao exame físico), foram colhidas 237 amostras com menos de 500.000 células somáticas/mL (grupo 1) e 77 amostras com mais de 500.000 células somáticas/mL (grupo 2). As amostras de leite do grupo 2 apresentaram valores estatisticamente mais altos de pH, condutividade elétrica, teor de cloretos e maior frequência de amostras positivas no CMT. O isolamento bacteriano foi mais freqüente no grupo 2 e esse resultado esteve relacionado mais com bactérias do gênero *Streptococcus* do que *Staphylococcus*.

PALAVRAS CHAVES: Leite de vaca, glândulas mamárias, microbiologia do leite, células somáticas

SUMMARY: Purposing to study some characteristics of the milk with high SCC (from udders without acute signs), 237 milk samples with less than 500,000 somatic cells/mL (Group 1) and 77 samples with more than 500,000 somatic cells/mL (Group 2) were collected in a Brazilian type A commercial dairy farm. Milk samples from group 2 showed statistically higher values of pH, electric conductivity, chloride concentration and higher frequency of positive results at California Mastitis Test. Bacteria growth was more frequent in group 2 and this result was assigned more to *Streptococcus* than to *Staphylococcus*.

KEYWORDS: Cow milk, mammary gland, milk microbiology, somatics cels

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 1(2):42-47; 2001.
Publicação Online da EMV - UFBA

INTRODUÇÃO

A mastite bovina compromete a produção leiteira quantitativa e qualitativamente, sendo a principal causa de aumento da contagem de células somáticas (CCS)¹ e de alterações, de intensidade variável, de outros parâmetros lácteos utilizados no diagnóstico da mastite (BATRA 1984; EMANUELSON 1987; COSTA 1986). Apesar da correlação significativa entre as provas de eletrocondutividade, CCS, *California Mastitis Test* (CMT), teor de cloretos e pH para o diagnóstico da mastite (VIANNI & NADER 1990) e da concordância entre CMT e CCS microscópica (VIANNI & NADER 1989), estes parâmetros também estão sujeitos a modificações conforme o sistema de criação, manejo de ordenha (ARAÚJO 1994), antecedentes de mastite (OSTENSSON 1993), patogenicidade do agente (EMANUELSON et al. 1987; KANGASNIEMI et al. 1986;

TAVERNA et al. 1993) e da capacidade reacional do hospedeiro (RYNIEWICS 1986) e conseqüentes alterações anátomo-patológicas (BENITES 1996) e clínicas (NATZE et al. 1972; WARD & SCHULTZ 1977). A CCS do leite é um parâmetro inflamatório considerado bom, como fator preditivo de processos inflamatórios, infecciosos ou não, da glândula mamária (SCHULTZ 1977), de glândulas mamárias sadias (BATRA & McALLISTER 1984) e de animais portadores assintomáticos, pois em cada uma destas condições haveria um número correspondente de células somáticas (WARD & SCHULTZ 1972; POUTREL & RAINARD 1982; GRANZOTI 1985).

Tendo em vista a escassez de pesquisas relacionadas às alterações do leite em vacas com elevada celularidade, objetivou-se na

presente investigação avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de amostras de leite colhidas de glândulas mamárias de vacas com elevada CCS.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 84 animais utilizados pertenciam à uma propriedade produtora de leite tipo A (São Paulo), da raça holandesa, mantidos semi-confinados, ordenhados três vezes ao dia, sem alterações no exame físico da glândula mamária e na prova do leite no fundo escuro (BIRGEL & BENESI 1982) e não haviam recebido medicação intramamária há, no mínimo, uma semana. Após a prova de fundo escuro e da anti-sepsia do orifício do teto, foram colhidas 314 amostras de leite em 2 alíquotas (uma para o exame microbiológico e outra para os exames físico-químicos e CCS).

Imediatamente após a colheita, procedeu-se o CMT (SCHALM & NOORLANDER 1957), determinação de pH em potenciômetro (Modelo 10, CELM[®]) e eletrocondutividade (Milk Checker, EISAL, CO. Ltd - Sumitomo Corporation do Brasil[®]). No laboratório, foi realizada a CCS microscópica¹ e determinação do teor de cloretos (Chloride Analyser - 925, Corning[®]) num prazo máximo de 10 horas após a colheita. As amostras foram semeadas em ágar-sangue com 5% de sangue de carneiro e incubadas a 37° C por 24 e 48 horas. Após a incubação, nas amostras de leite positivas ao exame bacteriológico, procedeu-se a identificação dos microrganismos através de provas bioquímicas (LENNETE et al. 1985) seguida de classificação (KRIEG & HOLT 1994).

As 237 amostras de leite com CCS de até 500.000 células/mL e as 77 com contagens superiores a este valor, constituíram os grupos 1 e 2, respectivamente, cujas médias e desvios padrão das variáveis quantitativas (cloretos, pH e eletrocondutividade) foram submetidas à

análise de variância ($\alpha = 0,05$), usando-se programa estatístico próprio (SAS INSTITUTE 1985). As variáveis qualitativas (CMT e exame bacteriológico) foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (BERQUÓ et al. 1981) ($\alpha = 0,05$) e o coeficiente global do teste (CORTÊS 1993) foi calculado quanto à positividade do CMT e do isolamento bacteriano.

RESULTADOS

Quanto à intensidade da reação no CMT das amostras do Grupo 1 (n= 237) e do Grupo 2 (n= 77), as frequências foram, respectivamente: 207 (87,3%) e 1 (1,3%) de reações negativas (-); 22 (9,3%) e 21 (27,3%) reações uma cruz; 7 (3%) e 37 (48%) reações duas cruces; 1 (0,4%) e 18 (23,4%) reações três cruces, sendo a diferença pelo teste do qui-quadrado, estatisticamente significativa. Entre os resultados positivos e negativos da prova do CMT o coeficiente global, ou seja, a eficácia da prova foi de 90% (Tab.1).

Os valores médios e respectivos desvios padrão do pH, eletrocondutividade e teor de cloretos das amostras dos grupos 1 e 2, foram de $6,56 \pm 0,008$ e $6,70 \pm 0,026$; de $4,42 \pm 0,04$ e $4,84 \pm 0,04$ mS e de $98,73 \pm 0,969$ e $124,87 \pm 4,469$ mg/100mL, respectivamente, sendo as diferenças estatisticamente significantes pela análise de variância (Tab.2).

Os Grupos 1 e 2 apresentaram respectivamente, 87 (37%) e 56 (73%), amostras de leite positivas ao exame bacteriológico, sendo a diferença avaliada pelo teste do qui-quadrado, estatisticamente significativa e o coeficiente global de 65,6%. Quanto ao isolamento de *Streptococcus* sp das amostras de leite, a diferença pelo teste do qui-quadrado mostrou-se estatisticamente significativa, tendo os grupos 1 e 2 apresentado frequências de 8 (3%) e 26 (34%) de positividade, respectivamente. Em relação aos *Staphylococcus* sp, as frequências de amostras

positivas dos grupos 1 e 2 foram sendo a diferença estatisticamente significativa respectivamente de 69 (29%) e 30 (39%), não (Tab. 3).

TABELA 1 - Resultados (n^o e %) da prova do CMT de amostras de leite colhidas de quartos mamários de 84 vacas da raça holandesa de propriedade leiteira tipo A, criadas no Estado de São Paulo, segundo a CCS, São Paulo, 1997.

CCS	(-)	(1+)	(2+)	(3+)	TOTAL
com até 500.000 céls/mL	207 (87,3%)	22 (9,3%)	7 (3%)	1 (0,4%)	237 (100%)
com mais de 500.000 céls/mL	1 (1,3%)	21 (27,3%)	37 (48,1%)	18 (23,4%)	77 (100%)
total	208 (66%)	43 (14%)	44 (14%)	19 (6%)	314 (100%)

13

CMT = *California Mastitis Test*: (-) reação negativa; (1+) pouco reagente; (2+) mediamente reagente; (3+) intensamente reagente.

$\chi^2 = 213,6$ - resultado estatisticamente significativo para $\alpha = 5\%$.

coeficiente global = $\frac{207 + (21+37+18)}{314} \cdot 100 = 90\%$

TABELA 2 - Valores médios e respectivos desvios padrão do pH, eletrocondutividade e teor de cloretos de amostras de leite colhidas de quartos mamários de 84 vacas da raça holandesa de propriedade de leite tipo A, criadas no Estado de São Paulo, segundo a CCS, São Paulo, 1997.

CCS	pH	eletrocondutividade (mS)	teor de cloretos (mg/100 mL)	n ^o
até 500.000 céls/mL	x = 6,56 s = 0,008	x = 4,42 s = 0,04	x = 98,73 s = 0,969	237
> 500.000 céls/mL	x = 6,70 s = 0,026	x = 4,84 s = 0,04	x = 124,87 s = 4,469	77

x = média; s = desvio padrão; n^o = número de amostras

TABELA 3 - Resultados (n^o e %) do isolamento de bactérias de amostras de leite colhidas de quartos mamários de 84 vacas da raça holandesa, de propriedade leiteira tipo A, criadas no Estado de São Paulo, segundo a CCS, São Paulo, 1997.

Grupo	(-)	(+)	Strep (+)	Strep (-)	Sta (+)	Sta (-)	total
1	150 (63 %)	87 (37 %)	8 (3 %)	229 (97 %)	69 (29 %)	168 (71 %)	237 (100 %)
2	21 (27 %)	56 (73 %)	26 (34 %)	51 (66 %)	30 (39 %)	47 (61 %)	77 (100 %)
total	171 (54 %)	143 (46 %)	34 (11 %)	280 (89 %)	99 (32 %)	215 (68 %)	314 (100 %)

1: amostras com até 500.000 células/mL; 2: amostras com mais de 500.000 células/mL; (-): sem isolamento bacteriano; (+): com isolamento bacteriano; Strep (+): com isolamento de *Streptococcus* sp; Strep (-): sem

isolamento de *Streptococcus* sp; Sta (+): com isolamento de *Staphylococcus* sp; Sta (-): sem isolamento de *Staphylococcus* sp.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento as amostras com mais de 500.000 células/mL (grupo 2) apresentaram maior positividade ao teste do CMT, pH mais alcalino, teores de cloretos mais elevados, maior eletrocondutividade e maior frequência de isolamento bacteriano concordando com a maioria dos autores (SCHALM et al. 1971; EMANUELSON et al. 1987; ARAÚJO 1994; KANGASNIEMI et al. 1986; FERREIRO et al. 1980; CIMIANO & ALVAREZ 1986; CUNHA 1988; COSTA et al. 1995; GORDON et al. 1980; SHELDRAKE et al. 1983), mas os valores absolutos encontrados nem sempre corresponderam ao que a literatura atribui a glândulas mamárias sadias ou alteradas mas sem manifestações agudas que muitos consideram formas subclínicas.

Quanto ao pH, o valor médio encontrado em amostras com mais de 500.000 células/mL de VIANNI & NADER FILHO 1990; ARAÚJO 1994), independentemente a presença de bactérias, foi considerado compatível com glândulas mamárias sadias, embora a maioria das amostras deste grupo com alta CCS, também apresentavam os demais parâmetros físico-químicos e microbiológicos alterados, mas estavam de acordo com os valores referidos por COSTA *et al.* (1995) para amostras provenientes de glândulas com mastite. Estas variações limitariam a utilização desta prova para o diagnóstico de mastite mas não a inviabilizariam, desde que associada a outras provas diagnósticas.

Os valores absolutos de eletrocondutividade foram inferiores aos descritos por muitos autores (COSTA et al. 1996; ARAÚJO 1994; KANGASNIEMI et al. 1986; CUNHA 1988; COSTA et al. 1995; SHELDRAKE et al. 1983) mas semelhantes aos de ARAUJO

(1994) em condições experimentais equivalentes e animais sob regime de produção de leite tipo A.

O CMT apresentou um coeficiente global alto, semelhante ao relatado por VIANNI & NADER FILHO, (1989), sendo eficiente para identificar amostras com altas CCS. As poucas amostras com baixa contagem e CMT positivo ou com alta contagem e CMT negativo já haviam sido descritas dada a subjetividade da interpretação das provas (SCHALM et al. 1971; ERSKINE et al. 1987).

Quanto às amostras com menos de 500.000 células/mL e com isolamento bacteriano e as amostras com mais de 500.000 células/mL mas sem isolamento bacteriano, provavelmente se deveram animais portadores assintomáticos (RYNIEWICA et al. 1986; ERSKINE et al. 1996) e processos inflamatórios não infecciosos, tratamentos recentes para mastite ou alterações fisiológicas (RYIEWICS et al. 1986; SCHULTZ 1977; POUTREL & RAINARD 1982), respectivamente, além da possibilidade de baixa patogenicidade do agente, do não isolamento de microrganismos em apenas um exame ou da presença de agentes infecciosos com exigências de crescimento incompatíveis com os empregados. Como qualquer prova diagnóstica, o resultado de um exame isoladamente representa apenas um momento dentre a enorme diversidade de um complexo nosológico dinâmico.

Neste estudo a presença do gênero *Streptococcus* foi significativamente maior nas amostras com alta CCS ressaltando a grande capacidade destas bactérias promoverem intensa reação na glândula mamária (EMANUELSON et al. 1987;

KANGASNIEMI et al. 1986; TAVERNA et al. 1993; GRANZOTI 1985). Apenas 3% das amostras de leite apresentaram isolamento de *Streptococcus*, provavelmente em consequência a reações inflamatórias iniciais, ausência de antecedentes de mastite, variação individual ou espécies menos patogênicas.

As frequências semelhantes de isolamento de *Staphylococcus* nos dois grupos deveu-se a ambiguidade destes agentes que tanto podem provocar intensa resposta celular quanto ficarem albergados nos próprios leucócitos possuindo diversos graus de patogenicidade entre suas espécies, embora fatores de patogenicidade e importantes lesões anatomo-patológicas têm sido atribuídos a espécies anteriormente consideradas não patogênicas (BENITES 1996; LISBOA et al. 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SCHALM, O.W. *et al.* **Bovine mastitis**. Philadelphia; Lea e Febiger, 1971. 360 p.
- BATRA, T.R.; McALLISTER, A.J. A comparison of mastitis detection methods in dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, n. 2, p.305 -12, 1984.
- EMANUELSON, U. *et al.* Comparison of some screening tests for detecting mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.4, p.880-7, 1987.
- COSTA, E.O. *et al.* Avaliação da condutibilidade elétrica do leite de glândula mamária com mastite: correlação com CMT e exames microbiológicos. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. p. 234. res. 970.
- VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.1, p.8-9, 1990.
- VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A. Eficiência do CMT na estimativa do número de células somáticas do leite bovino. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.3, n.2, p.5-6, 1989.
- ARAÚJO, W. P. **Constituição físico-química, celular e microbiológica de leites tipo A, B e especial colhidos de vacas criadas no Estado de São Paulo: contribuição à semiologia da glândula mamária**. São Paulo, 1994. 54p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- ÖSTENSSON, K. **Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder**. Studies of milk, lymph and blood from cows with healthy and mastitic mammary glands. Uppsala, Sweden, 1993. 67p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.
- KANGASNIEMI, R. *et al.* Absolute and relative effects of bacteria on the level of cell count, NAGase, BSA, Na, K and electrical conductivity in quarter foremilk of Ayrshire-cows. In: SYMPOSIUM ON MASTITIS CONTROL AND HYGIENIC PRODUCTION OF MILK, 1986, Espoo, Finland. **Proceedings...** Espoo, Finland, 1986. p.173-8.
- TAVERNA, M.A. *et al.* Influencia del estado de infección mamaria, del numero y momento de la lactancia sobre el recuento de celulas somaticas en leche individual de vacas. **Veterinaria Argentina**, v.10, n.92, p.114-21, 1993.
- RYNIEWICS, H.Z. *et al.* The level of somatic cells in seemingly healthy milk and infection of udder quarters in cows. In: SYMPOSIUM ON MASTITIS CONTROL AND HYGIENIC PRODUCTION OF MILK, 1986, Espoo, Finland, 1986. **Proceedings...** Espoo, Finland, 1986. p.1-5.
- BENITES, N.R. **Estudo dos aspectos microbiológicos e histopatológicos da mastite infecciosa bovina**. São Paulo, 1996. 169 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- NATZE, R.P. *et al.* Normal milk somatic cell counts. **Journal of Milk and Food Technology**, v.35, n.5, p.261-63, 1972.
- WARD, G.E.; SCHULTZ, L.H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.10, p.1428-31, 1972.
- SCHULTZ, L.H. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.170, n.10, p.1244-6, 1977.
- POUTREL, B.; RAINARD, P. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.7, p.1296-9, 1982.
- GRANZOTI, M. **Avaliação do leite tipo B pela contagem de células somáticas em rebanhos com mastite subclínica**. Belo Horizonte, 1985. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- BIRGEL, E. H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 177-213.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American**

- Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199, 1957.
- LENNETTE, E.M. *et al.* **Manual of clinical microbiology**, 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore, Willians & Wilkins, 1994.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary, 1985. 956p.
- BERQUÓ, E. S. *et al.* **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1981.
- CORTÊS, J. de ANGELIS. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela, 1993. p. 133-8.
- FERREIRO, L. *et al.* Influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite de gado mestiço. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208, p.19-24, 1980.
- CIMIANO, P.C.; ALVAREZ, J.A.G. Mamitis y calidad de la leche. **Hojas Divulgadoras**, Madrid, n.2, p.1-20, 1986.
- CUNHA, M. S. **Contribuição ao diagnóstico clínico das mastites: influência das fases da lactação, fases de ordenha e dos processos inflamatórios na composição físico-química, celular e microbiológica do leite de vacas da raça Holandesa Preta e Branca**. São Paulo, 1988. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- COSTA, E.O. *et al.* Comparison between pH and electric conductivity values of milk proceeding from quarters of healthy animals and animals with subclinical mastitis. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 25, 1995, Yokohama, Japão. **Abstracts...** Japão, 1995. p.234.
- GORDON, W.A. *et al.* Methods to detect abnormal milk - a review. **Journal of Food Protection**, v.43, n.1, p.58-64, 1980.
- SHELDRAKE, R.F. *et al.* Somatic cell count, electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.3, p.548-55, 1983.
- HEESCHEN, W. Determination of somatic cells in milk (technical aspects of counting). In: SEMINAR ON MASTITIS CONTROL. 1975, Bruxelles, Belgique, **Proceedings...** Bruxelas, 1975. p.79-92. (Document, 85)
- ERSKINE, R.J. *et al.* Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.11, p.1411-6, 1987.
- LISBOA, C.S. *et al.* Identificação de fatores de patogenicidade em amostras de *Staphylococcus coagulase negativo* isolados de mastite bovina. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. p. 264 res. 133.