

## Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite

[*Somatic cell counts variation in dairy cows according to mastitis pathogens*]

G.N. Souza<sup>1</sup>, J.R.F. Brito<sup>1</sup>, E.C. Moreira<sup>2</sup>, M.A.V.P. Brito<sup>1</sup>, M.V.G.B. Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610  
36038-330 – Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária - UFMG – Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Avaliou-se o efeito de patógenos da mastite sobre a contagem de células somáticas (CCS) em leite. Foram coletadas 3.987 amostras de leite de 2.657 animais oriundos de 24 rebanhos leiteiros localizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. As amostras de leite foram usadas para CCS e identificação de patógenos da mastite. Estatísticas descritivas, teste T para amostras independentes e modelo linear generalizado foram usados para análise dos dados. O modelo linear generalizado identificou os efeitos de rebanho, animal dentro de rebanho, ordem de parto, estação do ano e infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* como significativos na variação da CCS. O efeito de animal dentro de rebanho foi maior que o efeito de rebanho. *S. agalactiae* foi o patógeno responsável pelo maior aumento da CCS em vacas e apresentou em média 1.520.000 células/mL. Foi observado efeito específico dos patógenos na variação da CCS.

Palavras-chave: mastite bovina, qualidade do leite, bactéria

### ABSTRACT

*The influence of mastitis pathogens on variation of milk somatic cell count (SCC) was evaluated. Three thousand nine hundred eighty-seven milk samples were collected from 2,657 dairy cows in 24 herds located in the states of Minas Gerais and Rio de Janeiro. The milk samples were used to SCC and identification of mastitis pathogens. Descriptive statistics, T test for independent samples, and generalized linear model were used to data analysis. The generalized linear model identified the effects of herd, animal within herd, parity, year season, intramammary infection, and infection caused by Streptococcus agalactiae and Streptococcus spp. except S. agalactiae as significant on SCC variation. The effect of animal within herd was higher than the effect of herd. S. agalactiae was the pathogen responsible for higher SCC increasing and presented the average of 1,520,000 cells/mL. The specific effect on SCC variation was observed in the study.*

Keywords: bovine mastitis, milk quality, bacteria

### INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas (CCS) de vacas tem sido usada como ferramenta para monitorar os níveis de mastite em rebanhos leiteiros (Schukken et al., 2003). Vários fatores podem influenciar a variação da CCS de vacas em lactação, como idade, ordem de parto, período de

lactação, mês e estação do ano, entre outros, porém o estado de infecção é o principal fator responsável pela variação da CCS (Harmon, 1994). Dohoo e Leslie (1991) avaliaram a CCS de vacas e observaram que o limite de 200.000 células/mL foi o mais indicado para estimar uma nova infecção intramamária.

---

Recebido em 6 de novembro de 2008

Aceito em 10 de setembro de 2009

E-mail: gnsouza@cnppl.embrapa.br

Ainda que exista uma grande variação de resposta entre os animais para características idênticas de manejo, deve-se considerar qual característica de rebanho resulta em maior fonte de variação para CCS. Souza et al. (2005) identificaram e quantificaram fatores de risco para alta CCS associados a características de rebanho. Estudos têm mostrado que a relativa importância do rebanho em explicar a variação da CCS é menor que a variação devido à vaca individualmente (Leavens et al., 1997; Schepers et al., 1997).

As bactérias responsáveis pela mastite podem ser classificadas como patógenos principais e secundários (Harmon, 1994). Os patógenos principais mais comuns incluem o *S. aureus*, *S. agalactiae*, coliformes, estreptococos e enterococos de origem ambiental. Mastites causadas por estes patógenos resultam em grandes variações na composição do leite e na CCS (Harmon, 1994). Wilson et al. (1997) verificaram que a CCS média para animais com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi de 440.000 e de 640.000 células/mL, respectivamente. *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corinebacterium bovis* são considerados patógenos secundários, e infecções por estes microrganismos causam moderado processo inflamatório com CCS excedendo de duas a três vezes em relação a glândulas mamárias não infectadas (Harmon, 1994). As médias da CCS verificadas por Wilson et al. (1997) para *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *C. bovis* foram 170.000 e 150.000 células/mL, respectivamente. Brito et al. (1999) verificaram grande variação da CCS e de percentual de quartos mamários com CMT positivo em função dos agentes isolados, e o efeito específico de patógenos na variação da CCS pode ser usado em programas de controle da mastite (Haas et al., 2002). O principal objetivo deste estudo foi determinar o efeito dos patógenos causadores da mastite sobre a CCS de vacas leiteiras de rebanhos comerciais. Foram avaliados, também, o efeito de rebanho, a ordem de parto e o período de lactação sobre a CCS.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em 24 rebanhos bovinos leiteiros de junho de 2002 a julho de 2003. Os rebanhos localizavam-se nos municípios de Juiz de Fora-MG (1), Coronel Pacheco-MG (2),

Matias Barbosa-MG (1), Belo Horizonte-MG (1), Rio Preto-MG (3), Areal-RJ (1), Valença-RJ (2), Conservatória-RJ (2), Itaperuna-RJ (4), Porciúncula-RJ (4) e Natividade-RJ (3). A composição racial dos rebanhos variou de especializado a mestiço (Holandês = 3, Jersey = 3, Pardo Suíço = 1, Holandês x Gir = 17) Foram coletadas no total 3.987 amostras de leite oriundas de 2.657 animais.

As amostras de leite para CCS foram compostas dos quatro quartos mamários e coletadas diretamente em frascos específicos contendo conservante<sup>1</sup> e frascos esterilizados sem conservante para exames bacteriológicos. Foram coletadas amostras de leite de todos os animais em lactação, excluindo os que apresentaram mastite clínica no momento da coleta e que estavam sendo submetidos a algum tipo de tratamento com antibióticos. Os procedimentos de coleta e transporte das amostras de leite foram de acordo com Brito (2001) e Harmon et al. (1990).

A CCS dos animais foi realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em equipamento automatizado por meio de citometria de fluxo<sup>2</sup> de acordo com a International Dairy Federation - IDF (Milk..., 1995).

Os agentes causadores da mastite foram identificados no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite onde foi semeado 0,01mL de cada amostra de leite, com alça calibrada descartável, em cada quadrante de uma placa de ágar-sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foi feita a primeira leitura, seguindo-se nova incubação por mais 24 horas para a segunda leitura. Foram levados em consideração a morfologia e o número de colônias dos microrganismos isolados e interpretados segundo critérios propostos pelo National Mastitis Council - NMC (Laboratory..., 1987).

Os microrganismos foram identificados a partir de subcultivos em placas de ágar-soja tripticaseína e testes bioquímicos de acordo com

<sup>1</sup>Bonopol® - D&F Control Systems, Inc., Dublin, CA, EUA.

<sup>2</sup>Somacount 300 - Bentley Instruments, Inc., Chaska, MN, EUA.

recomendações de Harmon et al. (1990). As bactérias isoladas foram identificadas como *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Staphylococcus* spp. catalase negativo e *Corynebacterium* spp.

A variação da CCS dos animais foi avaliada por meio da aplicação do modelo linear generalizado (Dohoo et al., 2003). Os valores de CCS foram transformados para escore linear (EL) de acordo com Philpot e Nickerson (1991). O EL foi medido para cada animal, e o período de lactação (PEL) foi codificado em intervalos de 19 dias (1 para 0 a 19 dias após parto, 2 para 20 a 39 dias após parto, etc.). Para vacas com mais de 300 dias de lactação, foi dado o código 16 e com mais de três partos foi codificado como 4 (OPA = 4). A codificação do período de lactação e ordem de parto foi feita de acordo com Schepers et al. (1997).

As codificações para presença da infecção intramamária foram subdivididas de acordo com o agente responsável pela infecção: *S. aureus* (STAPHA), *S. agalactiae* (STRAG), *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* (STREP), *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (STACN) e *Corynebacterim* spp. (DIPT), codificando-se 1 para ausência, e 2 para presença do patógeno.

Estatísticas descritivas (média aritmética e geométrica, desvio-padrão e mediana) foram utilizadas para avaliar a CCS dos animais de acordo com os agentes da mastite, a presença de infecção e os tipos de infecção. Para avaliar a média do escore linear de acordo com a ordem de parto e presença de infecção, foi aplicado o teste T para amostras independentes descrito por Sampaio (1998). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS (Statistical..., 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de resultados de exames microbiológicos e de CCS usados para as análises estatísticas foi de 3.749 amostras. Dos resultados usados para análise estatística, 1.139 (30,3%) não apresentaram crescimento bacteriano e em 2.614 (69,7%) foi identificada a presença de pelo menos um patógeno da mastite. Do total de amostras que apresentaram crescimento bacteriano, foi observada infecção

mista em 404 (15,5%) amostras. Entre as amostras de leite que apresentaram crescimento bacteriano, foram isolados 826 (31,6%) *Corynebacterium* spp., 790 (30,2%) *S. aureus*, 551 (21,1%) *S. agalactiae*, 466 (17,8%) *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e 351 (13,4%) *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*. Foi isolado *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo em todos os rebanhos. Do total de amostras de animais, 238 (5,8%) foram classificadas como contaminadas no exame microbiológico de acordo com Harmon et al. (1990).

As médias aritmética e geométrica, desvios-padrão e medianas da CCS de acordo com o resultado dos exames bacteriológicos estão apresentados na Tab. 1. As amostras de leite sem crescimento bacteriano apresentaram, em média, 264.000 células/mL e em 50,0% dessas a CCS foi menor ou igual a 24.000 células. Nas amostras com isolamento de pelo menos um patógeno da mastite, a média da CCS foi de 779.000 células/mL, em 50,0% dessas a CCS foi igual ou maior que 342.000 células/mL. Entre os patógenos isolados, o responsável pela maior elevação da CCS foi *S. agalactiae*, com média aritmética de 1.520.000 e 50,0% das amostras com valor igual ou maior que 923.000 células/mL. *S. aureus* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* foram responsáveis pela segunda e terceira maior elevação da CCS, com média da CCS de 966.000 e 894.000 células/mL e com 50,0% das amostras com valores da CCS igual ou maiores que 509.000 e 641.000 células/mL, respectivamente. *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo apresentaram, em média, a CCS de aproximadamente 400.000 células/mL. Cinquenta por cento das amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo apresentaram valores da CCS igual ou menor que 166.000 e 205.000 células/mL. Entre os patógenos classificados como primários, no mínimo, 50% das amostras apresentaram a CCS acima de 500.000 células/mL, e, entre aqueles classificados como secundários, mais de 50% das amostras apresentaram a CCS abaixo de 205.000 células/mL. Resultados encontrados no estudo e por Brito et al. (1999) mostraram grande variação da CCS e de percentual de quartos mamários com CMT positivo em função dos

agentes isolados. O valor da CCS dos animais também é influenciado pela ordem de parto, período de lactação, estação do ano e manejo do rebanho conforme Harmon (1994) e Schepers et al. (1997). A variação da CCS entre animais para

o mesmo patógeno provavelmente foi relacionada a características individuais como idade, ordem de parto e período de lactação, conforme resultados encontrados anteriormente.

Tabela 1. Variação da contagem de células somáticas ( $\times 1.000/\text{mL}$ ) de acordo com a presença de infecção intramamária, a presença de infecção mista, o tipo de infecção mista e o tipo de agente etiológico

FV	Categoria	N	MA	DP	MG	Mediana
Presença de infecção	Não	1137	264	611	22	24
	Sim	2612	779	1.070	228	342
Agente etiológico	STAPHA	790	966	1.072	371	509
	STRAG	551	1.520	1.559	662	923
	STREP	351	894	922	449	641
	STACN	466	422	633	125	205
	DIPT	826	410	561	94	166

FV: fonte de variação; MA: média aritmética; DP: desvio-padrão; MG: média geométrica; STAPHA: *Staphylococcus aureus*; STRAG: *Streptococcus agalactiae*; STREP: *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*; STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase negativo; DIPT: *Corynebacterium* spp.

Os valores de EL transformados para CCS encontrados por Wilson et al. (1997) para amostras de leite com e sem isolamento variaram de 71.000 a 140.000 e 141.000 a 282.000, respectivamente. Os valores médios encontrados no estudo foram maiores que os encontrados por Wilson et al. (1997), mas, ao analisar a média geométrica e mediana, os dados foram semelhantes. Em relação às estatísticas descritivas da CCS para *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp., observou-se discreto aumento em relação aos que não apresentaram crescimento bacteriano e com resultados semelhantes aos encontrados por Harmon (1994) e Wilson et al. (1997).

Os resultados do presente estudo e os encontrados por Wilson et al. (1997) para amostras de animais com isolamento de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium bovis* mostraram o mesmo comportamento em relação à variação da CCS de acordo com os agentes.

Os resultados relativos à estatística descritiva da CCS de acordo com o tipo de bactéria envolvida na infecção intramamária mostraram que os patógenos classificados como primários (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*) e secundários (*Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp.) foram os responsáveis pelas maiores e menores variações da CCS, respectivamente, conforme Harmon (1994) e Schukken et al. (2003). Resultados encontrados neste e em outros

estudos mostraram que patógenos da mastite causam processos inflamatórios com intensidade diferente.

O modelo linear generalizado, considerando o tipo de infecção, foi significativo ( $P < 0,001$ ) e explicou 81,7% da variação da CCS. Os efeitos significativos foram relativos ao rebanho, animal dentro de rebanho, ordem de parto, estação do ano, presença de *S. agalactiae* e de *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*. Ano de coleta, período de lactação, presença de *S. aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp. não foram significantes estatisticamente. O efeito de animal dentro de rebanho foi o maior responsável pela variação da CCS, seguido pelo efeito de rebanho, alcançando juntos aproximadamente 70,0% da variação total.

Os valores de CCS foram transformados para EL com objetivo de comparar médias de acordo com ordem de parto e presença de infecção. As médias da CCS de acordo com a ordem de parto e presença de infecção intramamária estão apresentadas na Tab. 2. As médias da CCS para animais sem presença de infecção na primeira, segunda e acima da segunda lactação foram crescentes e diferentes, mostrando que o aumento da CCS está efetivamente associado às lactações ( $P < 0,01$ ). A mesma diferença entre os partos foi observada para animais que apresentaram presença de infecção ( $P < 0,01$ ). Foi também observada diferença entre as médias da CCS de animais com e sem infecção dentro das mesmas lactações ( $P < 0,01$ ).

### Varição da contagem de células...

Tabela 2. Médias do escore linear da contagem de células somáticas de acordo com a ordem de parto e a presença de infecção

Ordem de parto	Presença de infecção intramamária			
	Não		Sim	
	n	Média	n	Média
1	265	1,45aA	401	3,83aB
2	184	2,17bA	438	4,41bB
> = 3	309	2,78cA	764	4,81cB
T	1137	2,22A	2612	4,53B

Letras minúsculas e maiúsculas distintas nas linhas e colunas, respectivamente, indicam valores estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste t para amostras independentes; T: sem considerar ordem de parto.

O efeito da ordem de parto influenciou no aumento da CCS nos animais, independente da presença ou ausência de infecção, estando de acordo com os resultados encontrados por Leavens et al. (1997) e Schepers et al. (1997). O aumento da CCS com o avanço da idade e o período de lactação em animais sem infecção intramamária foram observados no presente estudo, conforme Harmon (1994). Entretanto, a variação da CCS em animais sem infecção de acordo com a ordem de parto poderia também ser causada por resultados falso negativo no exame bacteriológico. Como os valores médios da CCS dos animais de acordo com a ordem de parto, foi aproximadamente duas vezes maior para amostras com isolamento em relação às que não apresentaram crescimento bacteriano, o estado de infecção foi considerado o principal fator responsável pela variação da CCS, conforme relatado por Schukken et al. (2003).

Ao avaliar os resultados da análise de variância da CCS de acordo com o tipo de infecção, foi verificado que, entre os patógenos isolados, somente a presença de *S. agalactiae* ( $P < 0,001$ ) e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* ( $P < 0,01$ ) foi significativa e, nos resultados da estatística descritiva, foram maiores em relação aos isolamentos de *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp. Apesar de a presença de *S. aureus* não ter sido significativa no modelo linear generalizado, observaram-se altos valores para CCS nas estatísticas descritivas. Foi observado que 50,0% das amostras com isolamento de *S. aureus* apresentaram CCS maior que 501.000 células/mL. Os resultados mostraram que houve efeito específico de patógenos na variação da CCS, conforme resultados apresentados por Haas et al. (2002) e Schukken et al. (2003).

Foi verificado que a maior variação na CCS dos animais não foi devido a características de rebanho, como o manejo, e sim entre os animais submetidos a características idênticas de manejo. O resultado encontrado para as principais fontes de variação sobre a CCS mostrou que o efeito de rebanho foi menor que o efeito de animais dentro de rebanho, estando este de acordo com os resultados encontrados por Leavens et al. (1997) e Schepers et al. (1997). No modelo linear generalizado utilizado, foi considerado o efeito relacionado à característica individual, como ordem de parto e período de lactação, mas, de acordo com os resultados encontrados no estudo, houve outras características relacionadas aos animais submetidos ao mesmo manejo que os tornaram susceptíveis a infecções intramamárias e, conseqüentemente, responsáveis pela variação da CCS.

### CONCLUSÕES

A infecção intramamária foi o fator predominante responsável pelo aumento da CCS das vacas leiteiras. Os microrganismos patogênicos da mastite aumentam a CCS, sendo *S. agalactiae* responsável pelo maior aumento. O efeito de animal dentro de rebanho, como ordem de parto e período de lactação também influenciaram na variação da CCS de vacas leiteiras de rebanhos comerciais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, J.R.F. *Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 62).

- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.129-135, 1999.
- DOHOO, I. MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown: AVC, 2003. 706p.
- DOHOO, I.R.; LESLIE, K.E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.*, v.10, p.225-237, 1991.
- HAAS, Y.; BARKEMA, H.W.; VEERKAMP, R.F. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.1314-1323, 2002.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2103-2113, 1994.
- HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E. et al. *Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection*. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34p.
- MILK: Enumeration of somatic cells. Brussels: IDF, 1995. 8p. (IDF Standard 148A).
- LABORATORY and field handbook on bovine mastitis. Arlington: National Mastitis Council, 1987. 208p.
- LEAVENS, H.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y.H. et al. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.3219-3226, 1997.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis*. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada a experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221p.
- SCHEPERS, A.J.; LAM, T.J.G.M.; SCHUKKEN, Y.H. et al. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.1833-1840, 1997.
- SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v.34, p.579-596, 2003.
- SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. et al. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.251-260, 2005.
- STATISTICAL package for the Social Science. Version 8.0. Chicago: SPSS, 1998.
- WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pensilvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.2592-2598, 1997.