

Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas

Aetiology of the intramammary infections and somatic cell counts in primiparae cows

Luís Carlos Vianna¹; Ernst Eckehardt Müller^{2*}; Julio Cesar de Freitas²; Lucienne Garcia Pretto-Giordano³; Rogério Salvador⁴; Juliana Alves Dias⁴

Resumo

Foram estudados 200 vacas primíparas, provenientes de 12 propriedades leiteiras localizadas no oeste do Estado de São Paulo e norte do Estado do Paraná. Dos animais estudados, 86 (43%) apresentaram infecção em 140 (17,56%) quartos, no 7º dia pós-parto. Nos primeiros 150 dias de lactação, foram colhidas 2372 amostras de leite. Dessas, 504 (21,24%) foram positivas no exame bacteriológico. A partir do 14º dia de lactação, os microrganismos isolados, com maior frequência, foram os estafilococos coagulase negativos (ECN), em 213 (13,52%) amostras, *Corynebacterium* spp, em 97 (6,15%), e estafilococos coagulase positivos (ECP), em 32 (2,03%). No mesmo período, as médias das contagens de células somáticas (CCS), nos quartos infectados, foi de $469 \times 10^3/\text{ml}$ de leite e, nos quartos negativos, de $79 \times 10^3/\text{ml}$ de leite. Nos quartos infectados por ECP, *Streptococcus* spp, ECN e *Corynebacterium* spp, as médias das CCS foram de 1246×10^3 , 1094×10^3 , 372×10^3 e $308 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, respectivamente. As CCS quando comparadas às dos quartos opostos não infectados, apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$).

Palavras chave: Mastite; Bactérias; Vacas de Leite; Diagnóstico.

Abstract

Two hundred primiparae cows from 12 milk properties in the west region of the São Paulo state and north region of Paraná state, were studied. About the animals studied, 86 (43%), showed infections in 140 (17,56%) quarters on the seventh day after parturition. On the first 150 days of lactation, 2372 milk samples were achieved. About them, 504 (21,24%) were positive according to the bacteriological test. From the 14th day of lactations on, the microorganisms isolated more often, were the coagulase negative staphylococci (CNS) in 213 (13,52%) samples, *Corynebacterium* spp in 97 (6,15%) and coagulase positive staphylococci (CPS) in 32 (2,03%). In the same period, the average of the somatic cell counts (SCC) in the infected quarters, were $469 \times 10^3/\text{ml}$ of milk and in the negative quarters, of $79 \times 10^3/\text{ml}$ of milk. In the infected quarters by SCP, *Streptococcus* spp, CNS and *Corynebacterium* spp, the average of the SCC, were of 1246×10^3 , 1094×10^3 , 372×10^3 and $308 \times 10^3/\text{ml}$ of milk, respectively. The SCC when compared to the opposite non affected quarters, showed significant difference ($P < 0,05$).

Key words: Mastitis; Milk Cows; Bacteria; Diagnostic.

¹ Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal, Dep. de Med. Vet. Prev. (DMVP), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina-PR, e-mail: muller@uel.br

² Prof. Dr. Titular do DMVP/CCA/UEL.

³ Médica Veterinária, Msc, Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas, DMVP/CCA/UEL.

⁴ Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária, bolsista do PIBIC-CNPq-UEL.

* Autor para correspondência.

Introdução

Novilhas e vacas primíparas, normalmente, são ignoradas em programas de profilaxia e controle para mastite, por serem consideradas resistentes às infecções intramamárias (TRINIDAD; NICKERSON; ALLEYT, 1990). A partir do trabalho de Munch-Petersen (1970), na Austrália, que verificou 22% de infecções intramamárias no primeiro dia pós-parto, em vacas primíparas, vários pesquisadores direcionaram seus estudos para essa categoria de animais. Índices de infecções intramamárias, com variações de 4,5% a 96,8%, em vacas primíparas, e de 18,7 a 75,0%, em quartos, foram relatados por Mac Donald e Anderson, (1982), Oliver e Mitchell (1983), Boddie et al. (1987), Trinidad, Nickerson e Alleyt, (1990), Pankey; Drechsler e Wildman, 1991), Shearer e Harmon, (1993), Aarestrup et al. (1995) e Fox et al. (1995). No Brasil, Costa et al. (1999) e Laffranchi (2000) detectaram infecções intramamárias em vacas primíparas, no pós-parto, em 47,6% e 64,7%, respectivamente.

Um grande número de gêneros e espécies de microrganismos foram isolados de infecções intramamárias, em novilhas, no pré e pós-parto, predominando os estafilococos, estreptococos ambientais, enterobactérias e *Corynebacterium bovis* (MEANEY, 1981; PANKEY; DRECHSLER; WILDMAN, 1991; SHEARER; HARMON, 1993; WAAGE et al., 1999).

O diagnóstico da mastite pode ser realizado, através do isolamento e identificação do microrganismo, permitindo diferenciar os agentes contagiosos dos ambientais, possibilitando, assim, a adoção de medidas específicas de prevenção e controle (NMC, 1999). Provas indiretas, baseadas em variações dos componentes do leite, dentre os quais as células somáticas, lactose, sódio, cloro, potássio, soroproteínas e enzimas lisossomais, podem ser utilizadas para detectar infecções intramamárias (KITCHEN, 1981).

A contagem das células somáticas (CCS) no leite é um dos mais importantes indicadores, para ava-

liar a sanidade da glândula mamária (RUPP; BOICHARD, 1999). Os principais métodos de diagnóstico para mastite subclínica, baseados no aumento de células somáticas no leite, são o California Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT) e a CCS (PHILPOT; NICKERSON, 1992). A CCS monitora a mastite subclínica, especialmente a causada por agentes contagiosos, como o *S. aureus* e *S. agalactiae*. A CCS fornece, ainda, informações sobre a qualidade do leite, já que as mastites alteram a composição do leite, reduzindo os teores de lactose e caseína e aumentando o sódio e cloro (POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988). As pesquisas têm demonstrado que a produção de leite diminui, na medida em que aumenta a CCS. Contagens inferiores a 200.000/ml, provavelmente não indicam infecção da glândula mamária, enquanto contagens superiores a 300.000/ml são muito sugestivas de mastite. CCS próximas de 200.000, 500.000, 800.000 e 1.000.000/ml indicam uma diminuição na produção de leite de 6%, 9%, 11% e 12%, respectivamente (PHILPOT; NICKERSON, 1992).

Este trabalho teve por objetivo determinar a etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas e correlacionar a contagem de células somáticas com os agentes etiológicos.

Material e métodos

Foram examinadas 200 vacas primíparas de 12 rebanhos leiteiros, formados por diferentes raças, predominando a holandesa, sendo três da região norte do Estado do Paraná e nove do oeste do Estado de São Paulo. As propriedades utilizavam ordenhadeira mecânica. Para as novilhas não eram praticadas medidas específicas, visando a prevenção e controle das infecções intramamárias.

As colheitas de leite foram realizadas no 7º, 14º, 30º, 60º, 90º, 120º e 150º dia de lactação. A limpeza dos tetos era realizada por lavagem, secagem com papel toalha e anti-sepsia com álcool 70ºGL. Para os exames bacteriológicos, foram colhidos, aproximadamente, 3ml de leite, em frascos estéreis, com

tampa de rosca, e congelados a -20°C , por, no máximo, 10 dias, até o processamento.

No laboratório, o leite foi semeado em ágar sangue ovino 5% e as placas incubadas a 37°C , em aerofilia, por até cinco dias. A identificação dos microrganismos foi realizada, através das características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (KRIEG; HOLT, 1984; CARTER, 1988).

Para a CCS, foram colhidos aproximadamente 50 ml de leite por quarto, a partir do 14º dia de lactação, e conservados em dicromato de potássio, à temperatura ambiente. A CCS foi realizada pelo Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) por citometria de fluxo (Somacount 500 – Bentley Instruments, Inc., Estados Unidos).

Os animais que apresentaram duas culturas negativas consecutivas foram excluídos do experimento. A avaliação estatística foi realizada, através da Análise de Variância, utilizando-se o $\alpha = 5\%$ (GOMES, 1987; SPIGEL, 1993).

Resultados e discussão

Das 200 vacas primíparas estudadas, 86(43,00%) apresentaram infecções intramamárias no 7º dia de lactação e, das amostras de leite de 797 quartos examinados no mesmo período, 140(17,56%) apresentaram-se positivas ao exame bacteriológico (Figura 1). Considerando o total de 2372 amostras de leite estudadas durante o experimento, verificou-se que 504 (21,24%) foram positivas. Os índices de infecções intramamárias em vacas primíparas, descritos na literatura, são muito variáveis, em função das medidas de profilaxia e controle adotadas para a mastite na propriedade, produtividade dos animais e período da colheita das amostras de leite no pós-parto. Resultados de outros trabalhos obtidos com amostras de leite, colhidas no 7º dia de lactação, mostraram porcentagens de infecções bastante próximas (MATTHEWS; HARMON; LANGLOIS., 1992; AARESTRUP; JENSEN, 1997; PARDO et al., 1998).

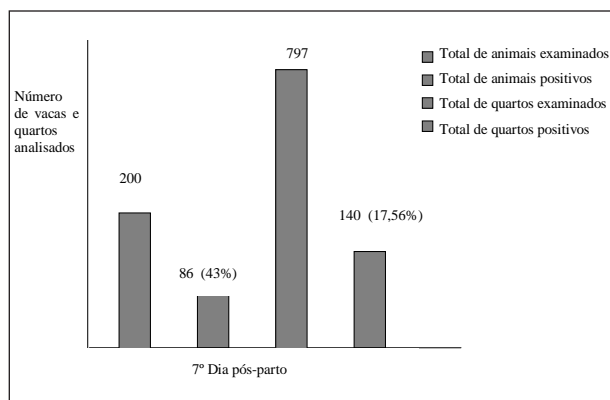


Figura 1 – Número de vacas primíparas e quartos infectados no 7º dia de lactação, de animais provenientes de 12 propriedades leiteiras, localizadas no oeste do Estado de São Paulo e norte do Paraná.

A Tabela 1 apresenta os microrganismos isolados, a partir do 14º dia de lactação, de 364 (23,1%) amostras de leite, de um total de 1575 e respectivas CCS. Os estafilococos coagulase negativos (ECN) foram isolados em 213 (13,52%) amostras de leite, com uma média de CCS de $372 \times 10^3/\text{ml}$, *Corynebacterium* spp em 97 (6,15%) com média de $308 \times 10^3/\text{ml}$, estafilococos coagulase positivos (ECP) em 32 (2,03%), com média de $1246 \times 10^3/\text{ml}$. Observa-se que a média da CCS de amostras de leite, provenientes de quartos com exames bacteriológicos positivos, foi de $469 \times 10^3/\text{ml}$ e das amostras de quartos negativos, de $79 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, diferença essa significativa ($P < 0,01$). Praticamente todas as pesquisas mostraram que os ECN são os principais responsáveis por infecções intramamárias em vacas primíparas no pós-parto (HARMON; LANGLOIS, 1989; TRINIDAD; NICKERSON; ALLEYT, 1990;. SHEARER; HARMON, 1993). No Brasil, Pardo et al. (1998) e Costa et al.(1999) também verificaram a predominância dos ECN em novilhas no peri-parto.

Na Tabela 2, estão relacionados os valores médios da CCS de quartos mamários infectados, de acordo com o agente etiológico e seus homólogos sadios. Independente do agente etiológico isolado houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre a CCS

média de quartos infectados e sadios. Para os ECP, a contagem média de células somáticas foi de $1023 \times 10^3/\text{ml}$ de leite. Estes números estão de acordo com Holmes et al. (1986), que afirmaram que os patógenos maiores, principalmente o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, causam grande aumento na CCS. Dohoo e Meek (1982) verificaram que os patógenos maiores (*S. aureus* e *S. agalactiae*) apresentaram CCS acima de $600 \times 10^3/\text{ml}$ de leite. As CCS obtidas por Ward e Schultz (1972), Davison et al. (1992) e Zafalon et al. (1999), relacionadas somente com ECP, foram de $1500 \times 10^3/\text{ml}$, $920 \times 10^3/\text{ml}$ e $656 \times 10^3/\text{ml}$, respectivamente. As amostras de leite com estreptococos apresentaram CCS média de $716 \times 10^3/\text{ml}$. Contagens superiores a essa foram observadas por Ward e Schultz (1972) e Hogan et al. (1988). Nas amostras de leite com isolamento de ECN, a média da CCS foi de $415 \times 10^3/\text{ml}$, enquanto para as amostras com *Corynebacterium* spp a contagem foi de $348 \times 10^3/\text{ml}$ de leite. Nos quartos homólogos com exame bacteriológico negativo, a CCS foi menor que $100 \times 10^3/\text{ml}$ de leite. Estes resultados estão de acordo com Harmon e Langlois (1986), que afirmam que as CCS em amostras de leite de quartos infectados por patógenos menores, ECN e *Corynebacterium* spp, normalmente duplicam ou triplicam. Contagens inferiores, $291 \times 10^3/\text{ml}$ e $200 \times 10^3/\text{ml}$, foram descritas por Davison et al. (1992) e Nickerson et al. (1995), respectivamente, em quartos infectados por ECN. Em relação ao *Corynebacterium* spp, Mettifogo et al. (1991) e Zafalon et al. (1999) encontraram contagens muito superiores às deste trabalho, $1032 \times 10^3/\text{ml}$ e $888 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, respectivamente.

A média da CCS nos quartos infectados de $469 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, verificada neste trabalho (Tabela 1), permite estimar uma queda na produção de leite entre 8 a 9%, levando em consideração a afirmação de Harmon (1998), que cita essa porcentagem de perdas na secreção de leite, em vacas com produção média de 6500/kg/vaca/ano. Raubertas e Shook

(1982) relataram que vacas primíparas, com CCS de 100×10^3 , 200×10^3 , 400×10^3 , 800×10^3 e $1600 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, apresentaram uma queda na produção, em 305 dias de lactação, de 200, 400, 600, 800 e 1000 libras, respectivamente. Segundo Philpot e Nickerson (1992), vacas primíparas, com CCS de $800 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, perdem 364 kg de leite por lactação. Zafalon et al. (1999) citaram uma diminuição de 16,7% na produção de leite, em vacas com infecções intramamárias por ECN, com uma média de CCS de $722 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, e, nas infecções por *Corynebacterium* spp com CCS de $888 \times 10^3/\text{ml}$ de leite, a perda foi de 30,9%.

Tabela 1 – Resultados dos exames bacteriológicos e contagem de células somáticas (CCS) de 1575 amostras de leite colhidas, a partir do 14º dia de lactação de vacas primíparas, provenientes de 12 propriedades leiteiras, localizadas no norte do Estado do Paraná e oeste de São Paulo.

| Microrganismos | Nº | (%) | CCS x $10^3/\text{ml}$ |
|-----------------------------------|------|---------|------------------------|
| Estafilococos coagulase negativos | 213 | (13,52) | 372 |
| <i>Corynebacterium</i> spp | 97 | (6,15) | 308 |
| Estafilococos coagulase positivos | 32 | (2,03) | 1.246 |
| <i>Streptococcus</i> spp | 13 | (0,83) | 1.094 |
| <i>Klebsiella</i> spp | 01 | (0,06) | 306 |
| <i>Actinomyces pyogenes</i> | 02 | (0,13) | 2.743 |
| <i>Escherichia coli</i> | 04 | (0,25) | 267 |
| <i>Enterobacter</i> spp | 02 | (0,13) | 326 |
| Quartos positivos ⁽¹⁾ | 364 | (23,1) | 469 |
| Quartos negativos ⁽²⁾ | 1211 | (76,9) | 79 |
| Total (1+2) | 1575 | (100) | |

Tabela 2 – Resultados dos exames bacteriológicos e a comparação da média da contagem de células somáticas (CCS) dos quartos infectados com os opositos sadios das amostras de leite colhidas nos primeiros 150 dias de lactação de vacas primíparas provenientes de 12 propriedades leiteiras do norte do Estado do Paraná e oeste do Estado de São Paulo.

| Microorganismo | Quartos infectados | | Quartos sadios | |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| | Nº de quartos | CCS x 10 ⁷ /ml | Nº de quartos | CCS x 10 ⁷ /ml |
| Estafilococos coagulase positivos | 21 | 1023 | 21 | 73 |
| <i>Streptococcus</i> sp | 11 | 716 | 11 | 96 |
| Estafilococos coagulase negativos | 121 | 415 | 121 | 91 |
| <i>Corynebacterium</i> spp | 28 | 348 | 28 | 79 |

Houve diferença significativa (ANOVA; P<0,05) entre os quartos infectados e os seus respectivos opositos para cada um dos grupos de microrganismos.

Conclusões

Os resultados deste trabalho mostram uma alta ocorrência de infecções intramamárias nas vacas primíparas estudadas, predominando os ECN, *Corynebacterium* spp e ECP. O aumento significativo na média da CCS, nos quartos mamários infectados pode representar uma diminuição na produção de leite, o que justifica a adoção de medidas especiais de prevenção e controle para mastite, em vacas primíparas.

Referências

AARESTRUP, F.M., et al. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta. Vet. Scand.*, Copenhagen, v.36, n.4, p.475-487, 1995.

AARESTRUP, F.M.; JENSEN, N.E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.80, p.307-312, 1997.

BODDIE, B.S., et al. Udder microflora un non lactating heifers. *Agri-Pract. Bov. Med. Immun.*, v. 8, p. 22-25, 1987.

CARTER, G.R. Fundamentos de bacteriologia e micologia. 3.ed. São Paulo : Roca, 1988. 249p.

COSTA, E.O., et al. Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. *Napgama*, São Paulo, v.2, n.1, p.16-20, 1999.

DAVISON, T.J. et al. Cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. *Can. J. Vet.*, v.56, p.275-280, 1992.

DOHOO, I.R.; MEEK, H.A. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.*, v.23, p.119, 1982.

FOX, L.K., et al. Survey of intramammary infection in dairy heifers at breeding age and first parturition. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.78, p.1619, 1995.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 12.ed. Piracicaba : Nobel, 1987.

HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Prevalence of minor pathogens and associated somatic cell counts. In: *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council*, 32., 1986. Madison, p.11

HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative Staphylococcus species. *Agri-Practice*, Santa Branca, v.10, p.29-34, 1989.

HARMON, R.J. Somatic cell counts: myths vs reality. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 37., 1998, Bellevue. *Proceedings...* Madson, 1998. p. 40-50,

HOGAN, J.S. et al. Rate of environmental mastitis in quarter infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* sp. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.71, p.2510-2525, 1988.

HOLMES, C.W. Effects of a decrease in milk yield, caused by once-daily milking or by restricted feeding, on the somatic cell count in milk from cows with or without subclinical mastitis. *Aust. J. Dairy Technol.*, Melbourne, v.51, n.1, p.8-11. 1986.

KITCHEN, B.J. Review of progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, Cambridge, v.48, p.167-179, 1981.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1984.

LAFFRANCHI, A. *Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação*. 2000. 37f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MAC DONALD, J.S.; ANDERSON, A.J. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: The early nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, v.42, n.8, p.1360-1370, 1982.

- MATTHEWS, K.R.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.R. Prevalence of Staphylococcus species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.75, p.1835-1839, 1992.
- MEANEY, W.J. Mastitis levels in spring-calving dairy heifers. *Irish. Vet. J.*, Dublin, v.35, p.205-209, 1981.
- METTIFOGO, E. et al. Mastite bovina por *Corynebacterium bovis* no Norte do Paraná, Brasil. *Semina*, v12, n.1, p.41-44, 1991.
- MUNCH-PETERSEN, E. Mastitis in bovine primiparae. *Vet. Rec.*, London, v.87, p.568-574, 1970.
- NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; BODDIE, R.L. Symposium: Mastitis in Dairy Heifers. *Champaign*, v.78, p.1607-1618, 1995.
- NMC. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison : National Mastitis Council. 1999.
- OLIVER, S.P.; MITCHELL, B.A. Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.66, p.1180-1183, 1983.
- PANKEY, J.W.; DRECHSLER, P.A.; WILDMAN, E.E. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.74, p.1550-1553, 1991.
- PARDO, P.E. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v.18, p.115-118, 1998.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros, 1992. 150p.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.71, p.1720-1727. 1988.
- RAUBERTAS, R.F.; SHOOK, G.E. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.65, p.419, 1982.
- RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking esse in first lactation Holsteins. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.82, p.2198-2204, 1999.
- SHEARER, J.K.; HARMON, R.J. Mastitis in heifers. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, Philadelphia, v.9, p.583-595, 1993.
- SPIGEL, M.R. *Estatística*. 3.ed. São Paulo : Makron Books, 1993. 643p.
- TRINIDAD, P.; NICKERSON, S.C.; ALLEYT, K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.73, p.107-114, 1990.
- WAAGE, S. et al. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.82, p.712-719, 1999.
- WARD, G.E.; SCHULTZ, L.H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.55, p.1428-1431, 1972.
- ZAFALON, L.F. et al. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Napagama*, n.6, p.4-6, 1999.