

# INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE OS CONSTITUINTES DO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ANÁLISE CLÍNICA SANGUÍNEA<sup>1</sup>

COLLA, M. F.<sup>2</sup>; GONZÁLEZ, F. H. D.<sup>3</sup>; DURR, J. W.<sup>4</sup>; SECCHI, P.<sup>5</sup>; VALLE, S. F.<sup>6</sup>;  
<sup>1</sup>MORO, D. V.<sup>7</sup>; DUDA, N. C. B.<sup>8</sup>; SCALON, M.<sup>8</sup>

**Resumo** - Inúmeras pesquisas demonstram perdas econômicas na cadeia produtiva do leite em decorrência a processos subclínicos ou clínicos de mastite, que acarretam diretamente em um produto de baixa qualidade. Desta maneira o objetivo deste trabalho foi demonstrar uma relação direta entre grupos de bovinos com diferentes contagens de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) com as perdas referentes ao aumento das mesmas no leite, estabelecendo uma relação com análises clínicas das amostras de sangue dos animais. Para o devido estudo foram analisadas 60 amostras de leite e sangue de bovinos, todos da raça holandesa, sem distinção entre o número de lactações. Esses foram divididos em três grupos: CCS abaixo de 600 mil cel/mL (G1); CCS acima das 600 mil cel/mL (G2) e presença de sinais clínicos de mastite, evidenciando altos níveis de CCS (G3). Foram analisadas de todos os animais, amostras de leite (CCS, CBT, Lactose, Gordura, Proteína e Sólidos Totais), e amostras de sangue para análise laboratorial de (Leucograma, Fibrinogênio, Proteína Plasmática Total e Hematócrito). Concluiu-se que os níveis de CCS tiveram relação direta nas perdas dos níveis de lactose e proteína dos animais estudados, mas não apresentou alterações nos demais constituintes, além disso, não apresentaram nenhuma relação direta com as análises hematológicas.

Palavras-chaves: lactose, mastite, fibrinogênio.

## Introdução

Com o desenvolvimento da pecuária leiteira na região Noroeste do Rio Grande do Sul a exigência na manutenção do controle higiênico-sanitário do rebanho tornou-se mais rigorosa, com o objetivo de manter as propriedades físico-químicas do leite e conseqüentemente, a qualidade do produto. Dentre as causas de alterações nas propriedades físico-químicas do leite está a mastite, que se caracteriza pela inflamação do parênquima da glândula mamária (Radostits, 2000).

De acordo com Detilleux (2006), a *Escherichia coli* é um importante patógeno virulento causador de mastite clínica com rápida apresentação dos sinais clínicos; outros causadores com o *Mycoplasma spp*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella spp*, *Klebsiella spp*. e *Enterobacter spp*. também causam perdas na produção de leite. Portanto, dependendo do patógeno causador da doença, a virulência da mastite acentua-se (GRÖHN, 2004). Dentre os agentes etiológicos isolados de

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinária do primeiro autor – UFRGS.

<sup>2</sup> Pós-graduando no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS.

<sup>3</sup> Prof., M. V., M.Sc., Ph.D. Laboratório de bioquímica clínica animal. Faculdade de Veterinária – UFRGS.

<sup>4</sup> Prof., Eng. Agr., M.Sc., Ph.D. Faculdade de Agronomia e Veterinária – UPF.

<sup>5</sup> Médica Veterinária Residente – UPF

<sup>6</sup> Profa. M. V. M.Sc. Laboratório de análises clínicas do curso de veterinária - UPF.

<sup>7</sup> Química, especialista em Ciência e Tecnologia de Alimentos, SARLE/UPF.

<sup>8</sup> Acadêmicas do Curso de Medicina Veterinária- UPF.

casos de mastite subclínica destacam-se os estafilococos coagulase positivos, como o *Staphylococcus aureus* e as bactérias do gênero *Corynebacterium* (ZAFALON, 2005).

Nos casos de mastite subclínica os sinais clínicos não estão presentes, ficando o diagnóstico restrito às análises do leite, onde são determinadas a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT). Na mastite clínica, os sinais mais observados no úbere são secreções anormais, tamanho anormal, dor, endurecimento, consistência e temperatura alteradas, além de reação sistêmica, no leite a presença de grumos, altos números de leucócitos e descoloração são evidentes (RADOSTITS, 2000).

As análises laboratoriais de amostras de sangue dos animais são ferramentas de auxílio na determinação da integridade e do bem estar animal. O fibrinogênio plasmático é uma proteína de fase aguda que pode se elevar nos processos inflamatórios (KANEKO, 1997). De acordo com Jain (1993), o nível de fibrinogênio plasmático é o melhor indicador de doença inflamatória nos bovinos.

O trabalho objetivou demonstrar a relação entre os parâmetros hematológicos e de qualidade do leite de vacas classificadas em três grupos conforme a CCS.

## **Materiais e Métodos**

Foram utilizadas 60 vacas da raça Holandesa, oriundas de propriedades de média e alta produção leiteira da região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, selecionadas após avaliação clínica.

As vacas foram divididas em três grupos conforme os valores de CCS estabelecidos na Normativa número 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002): Grupo um, 20 animais com CCS abaixo de 600.000 cel/mL (G1); Grupo dois, 20 animais com CCS acima de 600.000 cel/mL (G2); e Grupo três, 20 animais que apresentavam grumos no leite em pelo menos um dos tetos (G3). A presença de grumos foi observada no momento da ordenha, através do teste da caneca de fundo preto, o que caracterizava mastite clínica.

As amostras de leite foram obtidas de animais com e sem sinais clínicos de mastite. Foram armazenadas em frascos estéreis e após refrigeradas em temperatura inferior a 7°C e em seguida encaminhadas ao laboratório de Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros da Universidade de Passo Fundo (SARLE - UPF) para realização da CCS e CBT pelo método de citometria de fluxo. Os recipientes para armazenamento das amostras para a CCS continham Bronopol, como agente bactericida, e os recipientes para CBT continham Azidiol como agente bacteriostático.

O sangue foi obtido imediatamente após a ordenha, através de punção da veia coccígea com auxílio de tubos *Vacutainer* contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetrassódico). Após a colheita, as amostras foram refrigeradas e encaminhadas ao laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Passo Fundo onde foram realizadas as análises de contagem total de leucócitos (método manual), fibrinogênio plasmático (método de precipitação de proteínas), hematócrito e proteínas plasmáticas totais (PPT) através da centrifugação de microhematócrito e refratometria. Os parâmetros hematológicos foram comparados com os preconizados por Kaneko (1997).

As médias foram analisadas pelo programa SPSS 13.0 *Brief Guide* (2004), utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

## Resultados e discussão

Na análise de CCS do leite (Tabela 1) pode-se observar que o G3 apresentou média significativamente maior quando comparadas aos demais grupos. O mesmo pode ser observado para CBT. Com relação a gordura o G3 também apresentou maior média embora não houvesse diferença estatística significativa. Na proteína do leite, o G3 apresentou média superior, onde foi verificada diferença estatística significativa ao G2 e G1. Na análise da lactose, observou-se que o G3 apresentou valor inferior (3,78%) quando comparado com os demais grupos. Nos sólidos totais, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1: Média e desvio padrão das análises obtidas das amostras de leite de acordo com cada grupo.

	Grupos	N	Média	DP	EP
CCS	1	20	126,1a	54,25	12,13
	2	21	1214 b	745,76	162,74
	3	19	4341 c	1880,29	431,37
CBT	1	20	96,9a	73,09	16,34
	2	21	1987 b	1521,12	331,94
	3	19	6345 c	2845,28	652,75
Gordura	1	20	3,62a	0,89	0,20
	2	21	3,97a	0,47	0,10
	3	19	4,00a	0,98	0,22
Proteína	1	20	3,03a	0,32	0,07
	2	21	3,50 b	0,34	0,08
	3	19	3,51 b	0,67	0,15
Lactose	1	20	4,53a	0,21	0,05
	2	21	4,27a	0,32	0,07
	3	19	3,78 b	0,64	0,15
Sólidos totais	1	20	12,11a	0,94	0,21
	2	21	12,67a	0,73	0,16
	3	19	12,16a	1,48	0,34

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si no teste de Tukey a 5%. N= número de amostras por grupo, DP= desvio padrão, EP=erro padrão.

A CCS é um bom indicador da existência de uma infecção intramamária, quanto maior a CCS maior é a probabilidade de que a vaca esteja contaminada. O leite de um quarto infectado apresenta CCS geralmente superior a 200.000 cel/mL, indicando a ocorrência de mastite subclínica (SANTOS e FONSECA, 2007).

Conforme as análises laboratoriais do leite, a CCS mostrou-se significativamente diferente nos três grupos. De acordo com a cronicidade da enfermidade houve um maior deslocamento de leucócitos para dentro da glândula mamária, mostrando-se significativamente superior no G3.

No entanto, existe uma relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e as taxas de infecções intramamárias (SANTOS e FONSECA, 2007). Os mesmos autores afirmam que uma vaca apresentando mastite pode contribuir de forma significativa para a elevação CBT do leite. A elevação da CBT no leite

depende do tipo de microrganismo causador da infecção, do estágio e severidade da mastite e da porcentagem de animais infectados no rebanho. Das amostras analisadas, os três grupos pré-determinados demonstraram uma diferença significativa (Tabela 1), porém, não é possível determinar os agentes causadores, uma vez que a análise tem o caráter quantitativo e não qualitativo. A quantidade de bactérias dos animais do grupo 3 foi significativamente superior aos grupos 2 e 1 respectivamente.

O índice de gordura encontrado no estudo não demonstrou diferença significativa entre os três grupos. Em geral, a porcentagem de gordura do leite apresenta um pequeno decréscimo como resultado da infecção do úbere (PEREIRA, 1999). No entanto, o mesmo autor, ao avaliar 6.112 amostras de leite mastítico e não-mastítico pôde determinar que houve diferença significativa para a variável gordura entre os grupos. Desta maneira, a gordura no leite sofre maior influência do que as demais frações pela nutrição e condições ambientais (NORO & GONZÁLEZ, 2001) do que o escore CCS no leite. Os níveis de gordura dos grupos encontravam-se dentro do valor de referência 3,5 a 4,5% (NORO & GONZÁLEZ, 2001).

No mesmo estudo Pereira *et al* (1999) avaliou alterações na concentração de proteína, observando uma diferença significativa entre leite mastítico (3,36%) e não-mastítico (3,26%), isso foi atribuído ao aporte de proteína plasmática para a glândula a fim de combater a infecção. Dos três grupos avaliados, houve diferença significativa entre o G1 e os G2 e G3 que não diferiram entre si. O G1 tem a média inferior ao valor de referência estabelecido de 3,2 e 3,5% (NORO & GONZÁLEZ, 2001).

Ao determinar o percentual de lactose nas 60 amostras analisadas pode-se observar uma diferença significativa dos animais pertencentes ao G3 para os grupos 2 e 1, embora nenhum dos grupos tenha ficado com as médias dentro dos valores considerados normais de 4,6 e 5,2% (NORO & GONZÁLEZ, 2001), onde a lactose determinada foi inferior aos demais grupos. Durante o quadro clínico de mastite, a lactose reduz devido à menor síntese ocasionada pela destruição do tecido secretor, à perda da lactose da glândula para a corrente sanguínea, ao aumento da permeabilidade da membrana, e à utilização da lactose pelos patógenos intramamários (PRADA e SILVA, 2000).

A determinação do percentual de sólidos totais nos três grupos não demonstrou diferença significativa. O mesmo resultado encontrado por Prada e Silva *et al.* (2000), avaliando amostras de leite mastítico e não-mastítico. Observa-se que todos os grupos apresentaram média entre os valores médios determinados de 12 e 14% (NORO & GONZÁLEZ, 2001).

Nas análises hematológicas realizadas para os grupos nas diferentes variáveis (leucograma, fibrinogênio, proteína plasmática total e hematócrito) observa-se que o G3 apresentou as maiores médias (Tabela 2), em relação aos demais grupos, quanto as variáveis leucograma, fibrinogênio, e proteína plasmática total, e o G1 apresentou a maior média entre os grupos na análise do hematócrito sanguíneo. No entanto pode-se observar que não houve diferença significativa entre as variáveis distintas em relação aos grupos 1, 2 e 3 e seus respectivos escores de CCS.

O leucograma avalia alterações quantitativas e/ou morfológicas das séries leucocitárias (LOPES e CUNHA, 2002). A leucopenia aparece de forma precoce nas infecções bacterianas nos ruminantes, assim, bovinos com infecções sépticas, incluindo a mastite, podem apresentar leucopenia, linfopenia e neutropenia nos primeiros dias. No entanto, é necessário análise diferencial das células.

Tabela 2: Média e desvio padrão das análises obtidas das amostras de sangue de cada grupo.

	Grupos	N	Média	DP	EP
Leucograma	1	20	10271a	3630,9	811,9
	2	20	10006a	3971,7	888,11
	3	20	7509,2a	3278,1	733
Fibrinogênio	1	20	450a	201,31	45,01
	2	20	520a	250,47	56,008
	3	20	580a	278,34	62,23
PPT	1	20	8,28a	0,69	0,15
	2	20	7,99a	0,49	0,10
	3	20	8,35a	0,68	0,15
Hematócrito	1	20	29,6a	3,96	0,88
	2	20	29,45a	2,92	0,65
	3	20	28,05a	3,69	0,82

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si no teste de Tukey a 5%. N= número de amostras por grupo, DP= desvio padrão, EP=erro padrão.

Segundo Lopes e Cunha (2002) o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda produzida no fígado, isto é, em processos inflamatórios de diferentes causas, a concentração sérica de fibrinogênio pode elevar-se permanecendo alta por vários dias ou semanas como em casos de doenças crônicas. Em bovinos o fibrinogênio pode ser o único indicativo de uma resposta inflamatória ativa, no entanto, em doenças em que ocorre excessivo depósito de fibrinogênio tecidual, sua concentração sanguínea pode apresentar-se diminuída ou dentro dos padrões fisiológicos (LOPES e CUNHA, 2002). Borges et al. (2006), descreve um aumento nos níveis séricos de fibrinogênio em bovinos com processos inflamatórios agudo, decorrentes de pododermatite bovina, o que não foi observado nos casos de mastite clínica deste estudo. No presente estudo não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de fibrinogênio entre os grupos.

O hematócrito relaciona-se com a porcentagem de eritrócitos no sangue (LOPES e CUNHA, 2002). Um hematócrito abaixo dos valores estabelecidos pode ser um indicativo de anemia, por outro lado, valores acima sugerem um quadro de desidratação ou ainda de policitemia primária ou secundária. De acordo com os valores de referência estabelecidos nota-se que a média dos três grupos encontra-se dentro dos valores normais de 24 e 46%.

As proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e são constituídas de aminoácidos obtidos após a quebra e absorção intestinal (LOPES e CUNHA, 2001). Em relação a PPT os valores médios encontram-se entre 6 e 8 g/dL, desta maneira observa-se que o G2 encontra-se próximo ao limite enquanto os G1 e G3 encontram-se acima dos valores normais.

## Conclusão

A mastite é a doença de maior custo em fazendas leiteiras do mundo inteiro, aproximadamente cerca de 70 a 80% das perdas são decorrentes da mastite subclínica (PILLAI, 2001). Desta maneira o diagnóstico precoce se faz cada vez mais útil, em virtude de minimizar as perdas econômicas decorrentes da

enfermidade. Pode-se demonstrar que a análise laboratorial do leite ainda é a melhor maneira de se estabelecer uma relação entre a CCS e as perdas devido à processos inflamatórios clínicos ou subclínicos, como alterações na lactose e proteína observadas nas amostras estudadas. Para se obter uma melhor relação entre a CCS e as análises sanguíneas são necessários estudos mais aprofundados, em especial no que diz respeito às proteínas de fase aguda (haptoglobina) dos processos inflamatórios associados ao úbere.

### Referências Bibliográficas:

- BORGES, N. C.; et al. 2006. Valores leucocitários e nível de fibrinogênio plasmático de bovinos com pododermatite. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, v.7, n.1, p.97-102, jan./mar. 2006.
- BRASIL. 2002. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Disponível em <http://www.baldebranco.com.br/estatistica.htm>.
- DETILLEUX, J.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. 2006. Mathematical model of the acute inflammatory response to *Escherichia coli* in intramammary challenge. *J. Dairy Sci.* 89:3455-3465.
- GRÖHN, Y. T. et al. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3358-3374.
- JAIN, N. C.. 1993. *Essentials of veterinary haematology*. Pennsylvania: Lea & Febiger. 989p.
- KANEKO, J.J. et al. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press. 932p.
- LOPES, S. T.; CUNHA, C. M. S. 2004. *Patologia clínica veterinária*. Ed. Editora da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS.
- NORO & GONZALEZ, F. H. D. 2001. Síntese e secreção do leite. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ([www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/sintese\\_leite.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/sintese_leite.pdf)).
- PEREIRA, A. R.; ET AL. 1999. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* V.36 n.3. (<http://www.scielo.br>) em 2/10/2006.
- PILLAI, A. R. et al. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J. Dairy Sci.* 84:1413-1420.
- PRADA e SILVA, L. F. et al. 2000. Efeito no nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* V.37 n.4 (<http://www.scielo.br>) em 30/01/2007.
- RADOSTITS O.M., BLOOD D.C., GAY C.C. 2000. Mastitis. In: *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th W. B.Saunders Company LTD. Harcourt Publishers LTD. New York, EUA. Pp. 603 – 700.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. 2007. *Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. 1º Edição. Editora Manole LTDA.
- SPSS INC. 2004. *SPSS 13.0 Brief Guide*. 241p.
- ZAFALON, L. F.; et al. 2005. Comparação entre o califórnia mastitis test e a contagem de células somáticas como métodos auxiliares para o diagnóstico da mastite subclínica bovina por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* SPP. *B. Industr.anim., N. Odessa*, v.62, n. 1, p.63-69.