

***Corynebacterium bovis* E OS PADRÕES DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO BRASIL**

Cassiano Victória
Aristeu Vieira da Silva
Acácia Orieth Elias
Hélio Langoni

VICTÓRIA¹, C.; DA SILVA², A.V.; ELIAS³, A.O.; LANGONI⁴, H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 161-164, 2005.

RESUMO: Foram estudadas 60 amostras de leite de glândulas mamárias bovinas naturalmente infectadas pelo *Corynebacterium bovis* em estado puro, exuberante e que apresentavam pelo menos uma glândula contralateral com cultivo microbiológico negativo, provenientes de cinco propriedades leiteiras localizadas no interior do estado de São Paulo. Essas foram cultivadas em ágar sangue ovino e em agar MacConkey e submetidas à contagem eletrônica de células somáticas. Obtiveram-se medianas de contagens de células somáticas (CCS), 262 x 10³ céls/mL e 806 x 10³ céls/mL de leite, para as amostras negativas e positivas ao *Corynebacterium bovis* respectivamente, sendo que, em alguns casos positivos, a CCS superou 10.000.000 céls/mL de leite. Os dados obtidos no presente estudo sugerem que o *Corynebacterium bovis* é responsável por alterações celulares significativas no leite, podendo acarretar prejuízos aos produtores e à indústria de laticínios, na medida que se observam os padrões celulares estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em vigor desde setembro de 2002.

PALAVRAS-CHAVE: mastite, *Corynebacterium bovis*, células somáticas

THE *Corynebacterium bovis* AND THE SOMATIC CELL COUNTING STANDARDS IN BRAZIL

VICTÓRIA¹, C.; DA SILVA², A.V.; ELIAS³, A.O.; LANGONI⁴, H. The *Corynebacterium bovis* and the somatic cell counting standards in Brazil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 161-164, 2005.

ABSTRACT: Sixty milk samples from bovine mammary glands naturally infected by *Corynebacterium bovis* in pure state, which presented at least one contralateral gland with negative microbiological culture from five dairy farms in the State of Sao Paulo were studied. These samples were cultivated in MacConkey agar and submitted to an electronic Somatic Cell Counting (SCC). The medians of SCC results were 262 x 10³ cells/mL and 806 x 10³ cells/mL from negative and positive milk samples to *C. bovis* respectively. In some positive samples to the agent, it was observed SCC over 10.000.000 cells/mL of milk suggesting that *C. bovis* may be responsible for significant cell alterations in the milk, which might cause serious economic damages to the producers and to the milk industry, according to the cell standards established by Agriculture Ministry, Brazilian law from September of 2002.

KEY WORDS: mastitis, *Corynebacterium bovis*, somatic cells

EL *Corynebacterium bovis* Y LOS PADRONES CELULARES SOMÁTICOS EN EL BRASIL

VICTÓRIA¹, C.; DA SILVA², A.V.; ELIAS³, A.O.; LANGONI⁴, H. El *Corynebacterium bovis*, y los padrones celulares somáticos en el Brasil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 161-164, 2005.

RESUMEN: Fueron estudiadas sesenta muestras de leche de glândulas mamarias bovinas naturalmente infectadas por el *Corynebacterium bovis* en cultivo puro, provenientes de cinco haciendas lecheras localizadas en el interior del estado de São Paulo. Las muestras fueron cultivadas en agar sangre ovino y en agar MacConkey, y sometidas a cómputo electrónico de células somáticas. Se obtuvo medianas de los cómputos de células somáticas, 262 x 10³ céls/mL y 806 x 10³ céls/mL en la leche, para las muestras negativas y positivas al *Corynebacterium bovis* respectivamente, siendo que en algunos casos positivos, la CCS superó 10.000.000 céls/mL de leche. Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que el *Corynebacterium bovis* es responsable por alteraciones celulares significativas en la leche, pudiendo acarrear perjuicios a los productores y a la manufactura de lácteos, en la medida que se observan los moldes celulares establecidos por el Ministerio de la Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento en vigor desde setiembre de 2002.

PALABRAS-CLAVE: glândulas, *Corynebacterium bovis*, células somáticas

¹ Pós-graduando – Doutorado - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, SP, Brasil, Distrito de Rubião Júnior S/N - CEP: 18618-000 - email:cassianovictoria@fmvz.unesp.br.

² Professor Colaborador - UNIPAR - PR

³ Pós-graduanda- Doutorado.

⁴ Coordenador do NUPEMAS – Núcleo de Pesquisa em Mastites - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu.

Introdução

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, tem a capacidade de alterar as características físico-químicas do leite, bem como de lesar o tecido glandular mamário (DOMINGUES, 1996), podendo levar a uma redução na produção leiteira (SILVA, 1999; ZAFALON *et al.* 1999) e ainda à transmissão de microrganismos patogênicos ao homem e aos próprios animais.

Essa enfermidade é considerada a principal afecção que acomete os mamíferos, principalmente aqueles destinados à produção leiteira. Ela é responsável por grandes perdas econômicas na produção, tanto em nível de propriedade como na indústria (LANGONI, 2000), fazendo com que sejam descartados precocemente animais de alto desempenho produtivo.

Outro ponto a se considerar é a perda das características físico-químicas do leite (RAGIV SINGH, 1998), prejudicando assim o processo de industrialização de seus subprodutos, promovendo um menor rendimento de seus derivados, bem como depreciando sua qualidade. Além disso, existe o aspecto de saúde pública, pois microrganismos potencialmente patogênicos podem ser transmitidos ao homem pelo consumo do leite “in natura”, bem como com a ingestão de certos tipos de alimentos produzidos a partir do leite contaminado.

O papel do *Corynebacterium bovis* como agente das mastites é controverso. Alguns autores o consideram como um microrganismo de menor relevância (HONKANEN *et al.* 1984; BROOKS & BARNUN, 1984; LEVAN *et al.* 1985; POCHIECHA, 1989), outros afirmam sua importância como causadores de mastites clínicas e como responsáveis por alterações significativas em nível celular (COSTA *et al.* 1985; SCHUKKEN *et al.* 1989; HOGEVEEN, 1998).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as alterações na contagem de células somáticas de amostras de leite provenientes de glândulas mamárias naturalmente infectadas pelo *C. bovis* e discuti-las frente aos novos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicados no Diário Oficial da União do dia 18 de setembro de 2002.

Material e Métodos

Foram realizadas visitas a cinco propriedades leiteiras, com criação de bovinos da raça Holandesa Preta e Branca, dotadas de ordenhadeira mecânica, localizadas no Estado de São Paulo, onde inicialmente se realizou uma de triagem com a finalidade de determinar os animais a ser utilizados no experimento.

O teste escolhido para a triagem inicial, foi o Califórnia Mastitis Test (CMT) desenvolvido por SCHALM & NOORLANDER (1957), devido a sua praticidade e rapidez na obtenção do resultado, sendo considerados como positivas aquelas glândulas mamárias em que houve reação ao teste a partir de uma cruz (+), e negativas, aquelas amostras que não apresentaram reação ao teste. Essas últimas foram utilizadas

como controle negativo.

O leite dos quartos mamários positivos ao CMT foi submetido ao cultivo microbiológico em ágar sangue ovino 8% e agar MacConkey no Laboratório de Microbiologia e Citologia Láctea do Núcleo de Pesquisa em Mastites da FMVZ – UNESP - Botucatu, após a colheita de uma alíquota de aproximadamente 25 ml de leite em frascos estéreis, precedida da desinfecção do óstio da teta com álcool iodado a 5% e seu transporte em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável.

As amostras foram obtidas durante a primeira ordenha do dia e foram cultivadas sob condições aeróbicas por 24, 48, 72 e 96 horas, em estufa à temperatura de 37°C, com leitura a cada 24 horas.

De um total de 2792 tetas estudadas, obtiveram-se 147 amostras de leite, com isolamento de *C. bovis*, sendo que, em 60, obteve-se o agente em estado puro e exuberante.

Dos 104 cultivos negativos, foram selecionados 46, pois se tratavam de glândulas mamárias pertencentes aos animais que possuíam pelo menos uma glândula com isolamento puro e exuberante do agente.

Os animais, bem como seus respectivos quartos mamários, foram então identificados, e realizou-se uma segunda visita às mesmas propriedades para a colheita das amostras que seriam submetidas à CCS, como também um novo cultivo microbiológico, visando à confirmação da presença do agente em estado puro, a negatividade do grupo controle e a classificação taxonômica, utilizando o sistema API Coryne¹. O cultivo microbiológico, nessa segunda fase, foi realizado conforme descrito anteriormente.

As amostras para a CCS foram obtidas, colhendo-se 60 mL de leite, em frascos plásticos, contendo duas pastilhas de bronopol como conservante; em seguida, foram encaminhadas ao laboratório para análise eletronicamente no contador de células SOMACOUNT 300 - Bentley².

Para a análise estatística, inicialmente se realizou o teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov, seguido pela comparação dos valores de células somáticas entre amostras positivas e negativas para o *C. bovis*, utilizando o teste não paramétrico de MANN-WHITNEY (U) (CURI, 1997).

Resultados e Discussão

Obtiveram, como medianas das contagens de células somáticas, valores de 262×10^3 nas tetas negativas para *C. bovis*, e 806×10^3 céls/ml de leite, nas positivas para esse agente com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0016$), conforme expressa a figura 1.

PANKEY *et al.* (1985) observaram que os quartos infectados por esse agente, apresentavam $2,5 \times 10^5$ céls/mL, enquanto que os negativos $1,10 \times 10^5$ céls/mL e que quartos mamários negativos que tornaram-se positivos ao *C. bovis*, tiveram um aumento de $1,30 \times 10^5$ para $2,39 \times 10^5$ céls/mL de leite, o que está de acordo com os achados de NGATIA *et al.* (1991), que encontraram uma elevação de $5,60 \times 10^3$ para $33,37 \times 10^3$ céls/mL de leite em quartos naturalmente infectados pelo *C. bovis*.

¹ Biolab – Merieux S. A.

² Bentley Instruments

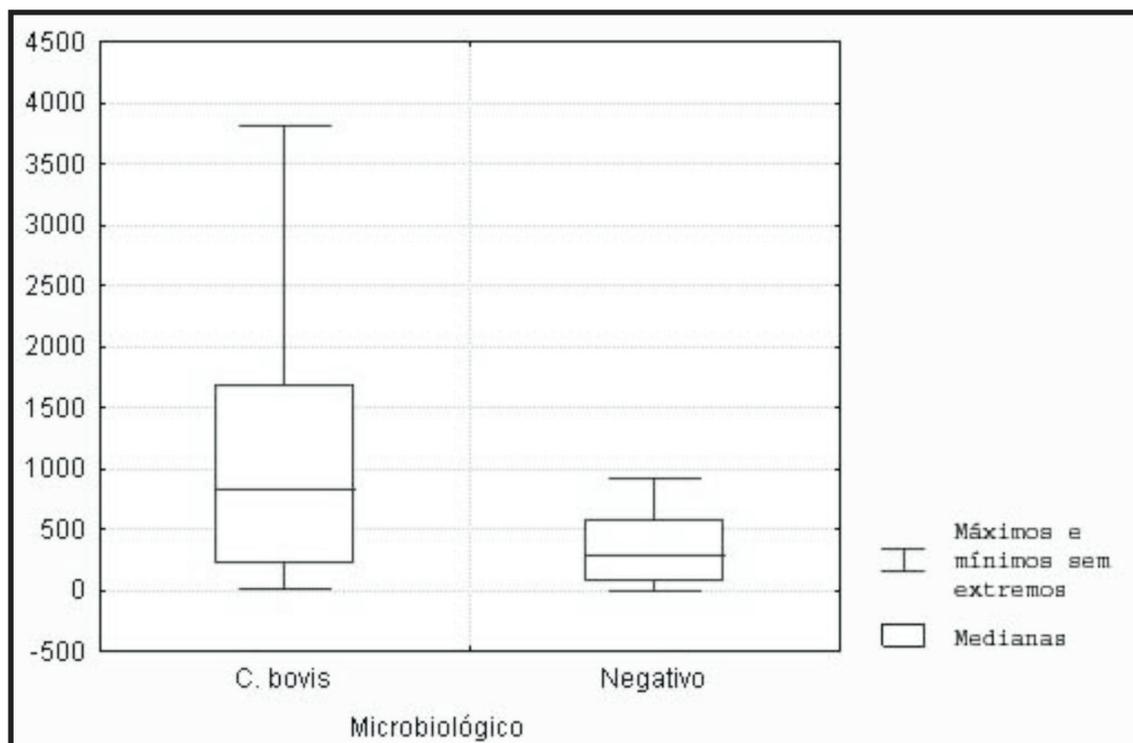


FIGURA 1 - Distribuição dos valores da mediana, máximos e mínimos sem extremos, para a contagem de células somáticas em céls/mL de leite, entre as amostras microbiologicamente positivas e negativas. Botucatu, 2004

METTIFOGO *et al.* (1991) reportaram que, em 29,31% das amostras com isolamento desse agente, a contagem de células somáticas apresentou-se inferior a 500.000 céls/mL, enquanto, em 70,67% das amostras, verificou-se uma variação de 500.000 até 3.880.000 céls/mL de leite, com média de 1.032.420 céls/mL. Da mesma forma, NICOLAU *et al.* (1996) encontraram um aumento de 282.720 para 6.636.720 céls/mL de leite em quartos com infecção subclínica, e LABHOM *et al.* (1998), um aumento de 66.000 para 538.000 céls/mL de leite. ZAFALON *et al.* (1999) verificaram um percentual de variação de 548,2% no aumento de células somáticas entre os quartos sadios e doentes, nas infecções intramamárias por esse agente.

Por outro lado, LEVAN *et al.* (1985) estudando 53 quartos mamários, dos quais isolou somente o *Corynebacterium bovis*, encontraram uma contagem de 119.000 céls/mL, concordando com os achados de BROOKS & BARNUM (1984), que, em infecção experimental por esse agente, encontraram ao redor de 146×10^3 céls/ml.

Os resultados do presente estudo indicam que, apesar de discretas, as alterações na quantidade de células somáticas foram significativas e permitem refletir sobre a importância de patógenos considerados de menor relevância nas infecções intramamárias, como o *C. bovis*, uma vez que geralmente, esses se encontram sós ou associados a outros agentes de maior importância nas mastites.

Em relação aos padrões estabelecidos pelo MAPA, pela Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002, os resultados revelam que a CCS de quartos mamários, infectados pelo *C. bovis*, apresentam-se superiores aos valores máximos admitidos para os leites tipo A e B, que é de 600.000 céls/mL, e muito próximos do limite máximo permitido para o leite tipo C, que será mantido até o ano de

2010 em 1.000.000 céls/mL, e superiores ainda ao limite de 750.000 céls/ml, que entrará em vigor em 2011. Ressalta-se que algumas amostras apresentaram ainda CCS superior a 10.000.000 céls/mL de leite, o que sem dúvida, acarretaria prejuízos de ordem financeira aos produtores e à indústria de subprodutos, bem como a depreciação da qualidade do produto final.

Conclusão

Pode-se concluir que o *C. bovis* é um patógeno de significado relevante nas mastites, seja pelo aumento da taxa de seu isolamento, observado nos últimos anos, bem como pela demonstração da elevação do conteúdo celular do leite, acarretando grandes perdas econômicas aos produtores e às indústrias de subprodutos lácteos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro mediante o processo 99/11996-0.

Referências

- BROOKS, B. W.; BARNUM, D. A. Experimental colonization of the Bovine Teat Duct with *Corynebacterium bovis* and the Effect on Milk Somatic Cell Count. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, v. 48; p. 141-145, 1984.
- COSTA, E. O.; DE CARVALHO, V. M.; COUTINHO, S. D. *et al.* *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 5, 117- 20, 1985.

- CURI, P. R. Metodologia e Análise da pesquisa em ciências biológicas. Botucatu: Tipomic, 1997. 263 p.
- DOMINGUES, P. F. Novas tendências no tratamento da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE BOVINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2, 1996, Nova Odessa. *Anais...* Nova Odessa, 1996, p. 33-43.
- HOGVEEN, H. et al. Monitoring sub clinical intramammary infections on a low bulk milk somatic cell count farm. In: INTERNATIONAL DAIRY HOUSING CONFERENCE, 4, 1998, St. Louis. *Proceedings...* St. Louis, 1998, p. 9-16.
- HONKANEN, B. T.; GRIFFIN, T. K.; DODD, F. H. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland I. natural infection. *Journal of Dairy Research*, v. 51, p. 371-378, 1984.
- LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v. 3, p. 57-64, 2000.
- LABHOM, R. et al. Factors influencing the somatic milk-cell-count in Dairy Cows. 1. influence of bacteriological findings, stage and number of lactation. *Milchwissenschaft*, v. 53, n. 2, p. 63-66, 1998.
- LEVAN, P. L.; BERHART, R. J.; ESLER, E. Effects of natural intramammary *Corynebacterium bovis* infection on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 3329-3336, 1985.
- METTIFOGO, E. et al. Subclinical mastitis attributable to *Corynebacterium bovis* in cattle from Northern Paraná, Brazil. *Semina Londrina*, v. 12, p. 41-4, 1991.
- NGATIA, T. A.; JENSEN, N. E.; ERG, B. B. Changes in the bovine udder quarts naturally infected by *Corynebacterium bovis*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 147, p. 463-468, 1991.
- NICOLAU, E. S. et al. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 1, n. 16, p. 35-38, 1996.
- PANKEY, J. W. et al. Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 2684-2693, 1985.
- POCIECHA, J. Z. Influence of *Corynebacterium bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. *Veterinary Record*, v. 125, p. 628, 1989.
- RAGIV SINGH, K. B.; KHERA, S. S.; SUDHAN, N. A. Effect of sub clinical and clinical mastitis on milk composition in cross-bred dairy cows. *Indian Veterinary Journal*, v. 75, p. 462-465, 1998.
- SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Association*, v. 130, p. 199-204, 1957.
- SCHUKKEN, Y. H. et al. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cells counts in bulk milk. *Veterinary Record*, v. 125, p. 393-6, 1989.
- SILVA, N. Diagnóstico de Mastite em Animais de Importância Econômica. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ UNESP, 1999, p. 51-55.
- ZAFALON, L. F. et al. Influência das bactérias do gênero *Corynebacterium* e *Estafilococcus* coagulase positivos e negativos, sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Revista do NAPGAMA*, a. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

Recebido para publicação em 21/09/2004
Received for publication on 21 September 2004
Recibido para publicación en 21/09/2004
Aceito para publicação em 08/03/2005
Accepted for publication on 08 March 2005
Acepto para publicación en 08/03/2005