

INFLUÊNCIA DAS FASES DA ORDENHA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE BOVINO¹

ANTONIO NADER FILHO², LUIZ AUGUSTO DO AMARAL², OSWALDO DURIVAL ROSSI JÚNIOR² e IUCIF ABRÃO NASCIF JÚNIOR³

ABSTRACT.- Nader Filho A., Amaral L.A., Rossi Júnior O.D. & Nascif Júnior I.A. 1995. [**Influence of the milking phases on the somatic cell count of the bovine milk.**] Influência das fases da ordenha sobre o número de células somáticas de leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 15(4):117-120. Fac. Ciênc. Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

One hundred ninety-five milk samples from 65 healthy quarters of 21 cows were submitted to somatic cell counts during the initial, middle and final phase of milking. The results showed that 65 (100%) milk samples obtained at the beginning of milking exhibited counts lower than 500,000 cels/ml, different from the harvested in the middle and final phase when counts higher to the mentioned values were found in 8 (12.31%) and 19 (29.23%) samples respectively. The differences revealed to be statistically significant showing the influence of the milking phases on the somatic cell counts. This fact is important for the diagnosis of subclinical bovine mastitis, as there exists a possibility of the occurrence of false-positive results in case milk samples are harvested in the middle or final phase of the milking process.

INDEX TERMS: Bovine milk, milking phases, somatic cell count.

SINOPSE.- Foram realizadas contagens de células somáticas em 195 amostras de leite colhidas de 65 quartos sadios de 21 vacas lactantes, durante o início, meio e final da ordenha. Os resultados obtidos evidenciaram que as 65 (100%) amostras de leite obtidas no início da ordenha, apresentaram contagens inferiores a 500.000 cels/ml, diferentemente das colhidas no meio e final da ordenha, e cujas contagens foram superiores ao referido valor em 8 (12,31%) e 19 (29,23%) amostras, respectivamente. Tais diferenças mostraram-se estaticamente significativas, evidenciando, portanto, a influência das fases da ordenha sobre o número de células somáticas do leite. Este fato parece assumir destacado valor no estabelecimento do diagnóstico das formas subclínicas da mastite bovina, uma vez que existe a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos, caso as amostras de leite a serem analisadas não sejam colhidas no início da ordenha.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leite bovino, fases da ordenha, células somáticas.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina constituiu-se numa das enfermidades mais importantes do rebanho leiteiro, capaz de determinar consideráveis perdas econômicas caracterizadas pela queda de produção láctea, pelo comprometimento de suas caracte-

terísticas físico-químicas e microbiológicas e pela perda total da capacidade secretora, além de representar importante problema de saúde pública (Leite et al. 1976, Blood & Henderson 1976, Vianni 1986, Nader Filho 1987, Nicolau et al. 1992).

A elevada ocorrência das formas subclínicas aliada a sua importância epidemiológica no mecanismo de transmissão desta enfermidade, bem como a redução da quantidade e o comprometimento da qualidade do leite secretado pelos quartos afetados, tem determinado a realização de várias investigações em nosso meio, com a finalidade de avaliar a eficiência dos métodos auxiliares de diagnóstico (Ferreiro et al. 1981, Langenegger et al. 1981, Nader Filho et al. 1985, Vianni & Nader Filho 1990, Nader Filho et al. 1991).

Dentre os vários métodos auxiliares de diagnóstico da mastite subclínica, a avaliação do conteúdo de células somáticas do leite, constitui-se em um excelente indicador do estado sanitário da glândula mamária. Segundo Plastridge (1958), Tolle (1971) e Poutrel (1982), o leite de vacas sadias raramente contém acima de 500.000 células somáticas por mililitro, ao contrário do que ocorre com o de vacas mastíticas, cujas contagens são geralmente superiores a este valor.

Apesar da elevada concordância verificada entre as quantidades anormais de células somáticas do leite e o exame bacteriológico na detecção das formas subclínicas da mastite bovina (Schalm & Noorlander 1957, Storper et

¹Aceito para publicação em 11 de setembro de 1995.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAVJ/Unesp), Jaboticabal, SP 14870-000.

³Curso de Graduação em Medicina Veterinária, FCAVJ/Unesp.

al. 1981), este método auxiliar de diagnóstico apresenta, contudo, a desvantagem de proporcionar resultados falso-positivos em função da variação fisiológica do conteúdo celular do leite decorrente do período de lactação (Syrstad & Ron 1978, Krammer et al. 1980, Kennedy et al. 1982, Emanuelson et al. 1988, Nader Filho et al. 1991), das épocas do ano (Kennedy et al. 1982, Kirk 1984), da idade das vacas (Kirk 1984) e dos distintos períodos do dia em que são realizadas as ordenhas (Cullen 1968, Convey et al. 1971, Syrstad & Ron 1978, Anderson & Nilson 1983, Nader Filho et al. 1991).

Desprende-se, portanto, que vários fatores podem influenciar o conteúdo celular do leite de vacas sadias, cujo conhecimento é de enorme interesse para o estabelecimento do diagnóstico das formas subclínicas da mastite bovina. Todavia, poucas são as informações relativas às variações do conteúdo celular do leite obtido ao longo das distintas fases da ordenha. Segundo Cunha (1988), as diferenças verificadas entre os terços inicial, médio e final da ordenha, não são suficientemente significativas para interferirem em seus resultados.

Tendo em vista o exposto e considerando a necessidade de maiores informações a este respeito, idealizou-se o presente estudo com o objetivo de conhecer a influência das fases da ordenha sobre o número de células somáticas do leite bovino procedente de quartos sadios.

MATERIAL E MÉTODOS

Propriedade Rural e Rebanho Leiteiro

A pesquisa foi realizada numa propriedade rural produtora de leite tipo A, localizada no Município de Jaboticabal/SP, cujo rebanho era constituído por 25 vacas lactantes, mantidas em sistema semi-intensivo de criação, pertencentes à raça holandesa, variedade preta e branca, puras ou mestiças, sendo a ordenha realizada mecanicamente, duas vezes ao dia.

Seleção dos animais e dos quartos do úbere

A escolha dos animais e dos quartos glandulares fundamentou-se na ausência de sinais clínicos de mastite bovina (Blood & Henderson 1976), bem como na realização do California Mastitis Test (Schalm & Noorlander 1957) e dos exames bacteriológicos (Apha 1976), com a finalidade de verificar a ausência de casos subclínicos desta enfermidade. Desse modo, foram selecionados 65 quartos glandulares pertencentes a 21 vacas lactantes.

Amostras de leite

Foram colhidas 65 amostras individuais com cerca de 100 ml de leite de cada quarto glandular (International Dairy Federation 1981) em três momentos distintos da ordenha, representados pelos terços inicial, médio e final, respectivamente, de modo a totalizar 195 amostras. Tais momentos foram determinados a partir da informação relativa à produção láctea da fêmea objeto de análise, obtida na ordenha realizada no dia anterior ao da colheita das amostras. Assim, a fêmea que havia produzido 6 litros de leite, colhia-se a amostra representativa do terço inicial no começo da

ordenha do primeiro litro de leite, enquanto as dos terços médio e final eram obtidas no início da ordenha do terceiro e quinto litros de leite, respectivamente. Após o acondicionamento em caixas de material isotérmico, contendo cubos de gelo, as referidas amostras eram transportadas para o laboratório onde realizavam-se as contagens de células somáticas.

Contagens de células somáticas

As contagens de células somáticas foram efetuadas através do método de Prescott & Breed, modificado pelo Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council (1968). Assim sendo, com o auxílio de uma pipeta automática, depositavam-se 10 microlitros da amostra de leite sobre a superfície de uma lâmina de vidro, os quais foram distribuídos em uma área de 1cm². Após a secagem, as lâminas de vidro contendo os referidos esfregaços foram imersas em xilol por 3 minutos. Decorrido este intervalo de tempo, efetuava-se a drenagem, para em seguida, imergí-la em solução de álcool etílico a 95% por 3 minutos. Após a secagem, os esfregaços foram corados de acordo com o método proposto por Broadhurst-Paley (1939) modificado, descrito por Schalm et al. (1971) e recomendado por Santos & Vilela (1983).

Finalmente, através do emprego da objetiva de imersão, foram contadas todas as células nucleadas presentes em 100 campos distintos, cujo resultado obtido foi multiplicado pelo Fator de trabalho (FT = 6496,46) do microscópio. O produto desta multiplicação expressava o número de células somáticas por mililitro de leite.

Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado com base no delineamento em parcelas subdivididas em blocos casualizados, sendo cada animal considerado como um bloco. As análises foram conduzidas utilizando-se o procedimento "GLM" (General Linear Models) do pacote estatístico SAS (1990).

RESULTADOS

O Quadro 1 mostra as contagens de células somáticas das amostras de leite de cada quarto mamário das vacas estudadas, distribuídas de acordo com o início, meio e final de ordenha. Observa-se que as 65 (100,0%) amostras de leite colhidas no início da ordenha apresentaram contagens celulares inferiores a 500.000 cels/ml, diferentemente das colhidas no meio e final da ordenha, cujas contagens foram superiores ao referido valor em 8 (12,31%) e 19 (29,23%) amostras, respectivamente.

Verifica-se, também, nos dados constantes do Quadro 1, que as médias aritméticas das contagens celulares das amostras de leite procedentes dos quartos anterior direito (133.021 cels/ml, 223.315 cels/ml e 375.482 cels/ml), anterior esquerdo, (125.284 cels/ml, 184.575 cels/ml e 354.656 cels/ml), posterior direito (141.189 cels/ml, 238.636 cels/ml e 501.093 cels/ml) e posterior esquerdo (110.821 cels/ml, 265.590 cels/ml e 413.127 cels/ml) apresentaram valores crescentes do início para o final da ordenha.

Quadro 1. Contagens de células somáticas das amostras de leite oriundo de quartos sadios, distribuídas de acordo com o início, meio e final da ordenha. Jaboticabal/SP, 1995

Vacas	Número de células somáticas por mililitro de leite											
	Início da ordenha				Meio da ordenha				Final da ordenha			
	AD	AE	PD	PE	AD	AE	PD	PE	AD	AE	PD	PE
A	77.957	32.482	58.486	51.972	103.943	110.439	12.992	32.482	58.468	84.453	45.475	12.992
B	38.978	12.992	(p)	25.985	64.964	58.468	(p)	84.453	90.950	84.453	(p)	77.957
C	51.971	84.453	(p)	129.929	64.964	162.411	(p)	233.872	123.432	214.383	(p)	597.674
D	188.397	149.418	285.844	331.319	227.376	188.397	552.199	584.681	1.344.767	954.979	1.650.100	2.182.810
E	(p)	441.758	422.269	(p)	(p)	474.241	461.248	(p)	(p)	1.084.908	604.170	(p)
F	58.468	129.929	77.957	19.489	123.432	136.425	90.950	129.929	253.362	513.220	292.340	370.298
G	(p)	271.851	(p)	(p)	(p)	266.354	(p)	(p)	(p)	357.305	(p)	(p)
H	97.446	(p)	168.907	207.886	207.886	(p)	253.361	123.432	123.432	(p)	246.865	103.943
I	116.936	38.978	38.978	64.964	292.340	207.886	84.453	90.950	331.319	389.783	188.397	428.766
J	233.872	(p)	58.468	71.461	155.915	(p)	84.453	71.461	155.915	(p)	77.957	58.468
K	58.468	45.475	32.482	45.475	25.985	58.468	116.936	64.964	331.319	253.361	292.340	71.961
L	149.418	84.453	136.425	103.943	25.985	32.482	103.943	136.425	376.794	162.411	181.900	77.957
M	(p)	(p)	(p)	110.439	(p)	(p)	(p)	51.971	(p)	(p)	(p)	90.950
N	318.326	188.397	441.759	266.354	610.667	279.347	993.958	513.220	708.114	1.110.894	1.403.235	350.808
O	71.461	58.468	90.950	97.446	656.142	103.943	227.376	292.340	766.582	467.743	1.461.703	928.993
P	(p)	58.468	77.957	(p)	(p)	129.929	84.453	(p)	(p)	181.900	285.844	(p)
Q	123.432	97.446	38.978	(p)	155.915	149.418	116.936	(p)	(p)	149.418	142.922	(p)
R	155.915	123.432	149.418	123.432	422.269	233.872	279.347	266.354	656.142	584.681	519.716	565.192
S	(p)	(p)	(p)	64.964	(p)	(p)	(p)	12.992	(p)	(p)	(p)	32.482
T	357.305	227.376	(p)	64.964	305.333	500.227	(p)	1.526.668	454.752	305.333	(p)	409.276
U	29.985	84.453	38.978	103.943	129.929	45.475	116.936	298.837	162.411	129.929	123.432	662.638
X	133.021	125.284	141.189	110.821	223.315	184.575	238.636	265.590	375.482	354.656	501.093	413.127

AD = Anterior Direito; AE = Anterior Esquerdo; PD = Posterior Direito; PE = Posterior Esquerdo; (p) = Quarto perdido ou portador de mastite; X = Média Aritmética.

O Quadro 2 mostra o resumo da análise de variância dos valores constantes do Quadro 1. Verifica-se que as contagens de células somáticas das amostras de leite colhidas no início, meio e final da ordenha, apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Quadro 2. Resumo da Análise de Variância referente à variável representada pelo número de células somáticas do leite

Fonte de variação	GL	QM	
Animal (A)	20	5,2793**	QM A/QM Res a
Teto (T)	3	0,1690	QM T/QM Res a
Resíduo a	41	0,4537	
Parcela			
Período (P)	2	16,8536**	QM P/QM Res b
Int. P x T	6	0,1990	QM Int/QM Res b
Resíduo b (Error)	122	0,3736	

(*) P<0,05; (**) P<0,01.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise dos dados constantes do Quadro 1, revela que as médias aritméticas das contagens de células somáticas das amostras de leite de cada quarto mamário apresentaram

valores crescentes do inícios para o final da ordenha. Cunha (1988), ao analisar 60 amostras de leite procedentes de 20 quartos glandulares de 5 vacas sadias, pertencentes a uma propriedade rural produtora de leite tipo B, situada na região de Campinas/SP, observou variação semelhante do conteúdo celular do início para o final da ordenha.

A análise dos valores inseridos no Quadro 2 evidencia que as variações observadas nas contagens de células somáticas das amostras de leite colhidas no início, meio e final do período de lactação, foram estatisticamente significativas. Tal achado, difere dos obtidos por Cunha (1988) que apesar de também ter verificado contagens crescentes do início para o final de ordenha, concluíram que tais variações não foram estatisticamente significativa; porém esse autor não traz detalhes sobre a colheita de amostras de leite nos três momentos distintos da ordenha.

Os achados deste trabalho parecem assumir destacada importância no estabelecimento do diagnóstico das formas subclínicas de mastite bovina, uma vez que o número de células somáticas do leite pode sofrer a influência das fases da ordenha. Assim sendo, por ocasião do emprego dos métodos auxiliares de diagnóstico desta enfermidade que se fundamentam na avaliação do conteúdo celular do leite, existe a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos, caso as amostras objeto de análise não sejam colhidas no início da ordenha.

Agradecimentos.- Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira, Departamento de Ciências Exatas da FCAVJ/UNESP, pelos valiosos serviços prestados através da realização da análise estatística dos dados obtidos no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- Anderson I. & Nilson H.U. 1983. Influence of feeding on cell counts of food. Day-to-day variation in cell counts and relationship between different milk parameters and cells count. Report nº 114, Dep. Animal Husbandry, Sw. Univ. Agr. Sci., Uppsala, Sweden.
- American Public Health Association 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination. APHA, Washington. 701 p.
- Blood D.C. & Henderson J.A. 1976. Medicina Veterinária. 3ª ed. Interamericana, México. 1008 p.
- Brolund L. 1985. Cell counts in bovine milk. Acta Vet. Scand., Suppl. 80: 1-123.
- Convey E.M., Muller L.S. & Tucker H.A. 1971. Somatic cell counts in bovine milk. J. Dairy Sci. 54(3): 360-363.
- Cullen G.A. 1968. Short term variations in the cell counts of milk. Vet. Rec. 80(22): 649-653.
- Cunha M.S. 1988. Contribuição ao diagnóstico clínico das mastites. Influência das fases de lactação, fases da ordenha e dos processos inflamatórios na composição físico-química, celular e microbiológica do leite de vacas da raça holandesa preta e branca. Dissertação de Mestrado, Fac. Med. Vet. Zootec., USP, São Paulo.
- Emanuelson W., Wrenn T.R. & Wever P. 1988. Potential of differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. Acta Vet. Scand. 30:475-481.
- Ferreiro L., Santos E.C. & Silva M. 1981. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 33(1): 31-37.
- International Dairy Federation 1981. Laboratory Methods for Use in Mastitis Work. Brussels.
- Kennedy B.W., Sethar M.S., Tong A.K.W., Moxley J.E. & Downey B.R. 1982. Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. J. Dairy Sci. 65:275-280.
- Kirk J.H. 1984. Somatic cells in milk: current concepts. Compendium on Continuing Education, Veterinarian-Large Animal Section 6(4): 5237-5243
- Krammer L., Lederer J., Frank W., & Seefeldt G. 1980. (Cit. Brolund 1985)
- Langenegger J., Vianni M.C.E. & Bahia M.G. 1981. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. Pesq. Vet. Bras. 1(2): 47-52.
- Leite, R.C. Brito J.R.T. & Figueiredo J.B. 1976. Alterações da glândula mamária de vacas tratadas intensivamente, via mamária, com penicilina em veículo aquoso. Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 28(1): 27-31.
- Nader Filho A., Schocken-Iturrino R.P., Rossi Júnior O.D. & Cembranelli E. 1985. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto/SP. Pesq. Vet. Bras. 5(2): 3-6.
- Nader Filho A. 1987. Mastite estafilocócica: características microbiológicas do leite pasteurizado tipo B "in natura" e pasteurizado. Isolamento de cepas de *S. aureus*, produção de enterotoxinas e determinação da origem provável, humana ou bovina. Tese de Livre-Docência, Fac. Ciênc. Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP.
- Nader Filho A., Anchieta F.C., Amaral L.A. & Rossi Júnior O.D. 1991. Variação do número de leucócitos polimorfonucleares em amostras de leite de vacas sadias, durante os diferentes meses do período de lactação. Ars Vet., Jaboticabal, 7(1): 13-19.
- Nicolau E.S., Nader Filho A., Amaral L.A. & Penha L.H.C. 1992. Influência da mastite estafilocócica sobre a produção láctea dos quartos afetados. Ars Vet., Jaboticabal, 8(2): 118-124.
- Plastring W.N. 1958. Bovine mastitis - a review. J. Dairy Sci. 41: 1141-1181.
- Poultrel B. 1982. Susceptibility to mastitis: a review of factors related to the cow. Annual Res. Vet. 13(1): 85-89.
- Santos E.C. & Vilela M.A.P. 1993. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério de avaliação de qualidade. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 35(6): 907-919.
- SAS 1990. User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schalm O.W. & Noorlander D.D. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130(5): 199-204.
- Schalm O.W., Carroll E.J. & Jain N.C. 1971. Bovine Mastitis. Lea & Febiger. Philadelphia, p. 182-282.
- Storper M., Ziv G. & Saran A. 1981. Evaluation of several milk sampling methods for the diagnosis of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* mastitis. Refuah Vet. 38(4): 149-153.
- Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council 1968. Direct microscopic somatic cell count in milk. J. Milk Food Technol. 31(1): 350-354.
- Syrstad O. & Ron I. 1978. Day-to-day variation in cell counts in milk. Nord. Vet. Med. 30: 350-354.
- Tolle A. 1971. A monograph on bovine mastitis. Bull. Int. Dairy Fed., p. 1-23.
- Vianni M.C.E. & Nader Filho A. 1991. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. Bolm Ciênc. Vet. 4(1): 8-9.
- Vianni M.C.E. 1986. Influência de agentes etiológicos da mastite subclínica bovina sobre as características físico-químicas do leite. Dissertação de Mestrado, Inst. Veterinária, UFRRJ, Itaguaí, RJ.