

ESTUDO DA AÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE DO LEVAMISOLE NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA⁽¹⁾

WILSON DE OLIVEIRA VIANNA⁽²⁾, DELCÁCIO JOAQUIM DA SILVA⁽²⁾, WANDER RAMOS RIBEIRO⁽³⁾, JOÃO BATISTA PEREIRA DE CARVALHO⁽³⁾, LUIZ BENITO GAMBINI⁽³⁾, PEDRO BIONDI⁽³⁾ e EVALDO FISCHER FERRAZ⁽⁴⁾

RESUMO: Procurou-se verificar os efeitos de imunizações contra a mastite bovina e suas conseqüências na produção leiteira, qualitativa e quantitativamente. Foram utilizadas 28 vacas do tipo "Mantiqueira", entre a 3ª e 10ª lactação, do rebanho da Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba-SP, produtoras de leite do tipo "B", durante uma lactação. Foram organizados 4 tratamentos com animais negativos ao "California Mastitis Test" (CMT), a partir do 21º dia após o parto. Os tratamentos foram A: controle (sem aplicações de levamisole e vacina); B: aplicações de levamisole, C: aplicações de vacina e D: aplicações de levamisole + vacina. As vacas receberam as aplicações dos produtos no 21º, 35º, 49º e 180º dia. Foram analisadas amostras de leite e sangue usando-se as seguintes provas: CMT (California Mastitis Test), redutase, pH, leucometria, dosagens de imunoglobulinas, proteínas totais, albumina, isolamento e identificação de microorganismos. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Termos para indexação: vacina, levamisole, imunoglobulinas, imunização, soro, mastite, leite.

Use of Levamisole in the control of bovine mastitis

SUMMARY: This research was held to verify the immunization effects against bovine mastitis and its consequence on the milk production. It was used 28 Mantiqueira type cows, from the Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba-SP, during one lactation period. The cows were submitted to "California Mastitis Test" (CMT) at the 21th day post parturition and were distributed in 4 treatmens: A: control (no levamisole and vaccine application); b: Levamisole application; C: vaccine application (pool pyogenic bacterial cepa) and D: vaccine + Levamisole application. The cows received these treatments at the 21th, 35th, 49th and 180th days. Blood and

-
- (1) Projeto IZ-14-018/89. Financiado pela FUNDEPAG. Recebido para publicação em novembro de 1992.
(2) Seção de Higiene Zootécnica e Análises. Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.
(3) Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba.
(4) Seção de Bacteriologia Animal. Instituto Biológico.

milk samples were submitted to the following tests: CMT, pH, white blood cells counting, dosage of immunoglobulins, total protein, albumin and isolation and identification of microorganisms. The statistical analysis showed no significant differences between treatments for all the variables measured.

Index terms: vaccines, Levamisole, immunoglobulins, immunization, serum, mastitis, milk.

INTRODUÇÃO

Em todo o mundo a mastite continua ser uma das mais custosas doenças tanto para a pecuária como para a indústria leiteira.

Segundo BLOSSER (1979), as perdas anuais nos U.S.A. chegaram a US\$ $1,3 \times 10^9$; sendo que 69% deste prejuízo veio da redução da produção como resultado da mastite sub-clínica, correspondendo a um prejuízo de US\$ 81,32 por vaca leiteira.

As perdas globais com as mastites, incluindo-se despesas de tratamentos, serviços veterinários, animais perdidos por descarte precoce, bem como o leite não aproveitado, podem chegar a 70% da produção (BLOOD et al. 1983).

WILSON (1961), na Inglaterra, concluiu que as perdas pelas mastites sub-clínicas devidas ao *Staphylococcus aureus* chegavam a 3 vezes mais que aquelas oriundas das mastites clínicas, enquanto FERREIRO et al. (1979) estimaram reduções médias de 43% na produção de vacas mestiças zebuínas.

Segundo DODD (1983), não é possível controlar as infecções mamárias para todos os tipos de organismos patogênicos com uma simples técnica de controle, já que vários fatores entram em jogo, tais como: manejo sanitário, controle correto de ordenhadeiras mecânicas, medidas higiênicas e terapêuticas, sendo, na prática, difícil de adequar todos estes fatores.

Numerosos trabalhos estrangeiros confirmam os benefícios das imunizações (vacinações) como grande auxiliar no controle da mastite bovina, pelo aumento dos mecanismos imunológicos de defesa orgânica, tanto humorais como celulares (SMITH, 1983; TARGOWSKI, 1983). São escassos, em nosso meio, estudos nesse sentido. TARGOWSKI (1983) estabelece em discussão detalhada, os futuros imunológicos, tanto humorais como celulares que poderiam prevenir as infecções intramamárias afirmando que a resistência tissular poderia ser aumenada pelas imunizações adequadas. Insiste,

também, que tal resistência tissular não poderia ser substituída por agentes terapêuticos como os antibióticos e anti-inflamatórios e nem mesmo pelas mais rigorosas medidas de higiene.

Os trabalhos pioneiros de RENOUX & RENOUX (1973, 1974), evidenciaram a ação imunomoduladora do levamisole, droga usada como anti-helmíntica, que demonstrou efeito imuno-estimulante inespecífico, quando usada em conjunto com a vacinação contra a *Brucella abortus* em ratos, conseguindo um alto grau de proteção ao desafio.

Está bem estabelecida a ação farmacológica do levamisole que atua pelo seu radical imidazólico, provocando um aumento nas quimiotaxia e fagocitose, tanto de leucócitos como dos macrófagos, intensificando a reação dos linfócitos. Além disso, na área de Medicina Humana, está bem demonstrada a ação anti-artrítica e anti-cancerígena deste fármaco (BELLANTI, 1981).

Na área médico-veterinária SIQUEIRA (1987), constatou os efeitos benéficos do levamisole no tratamento de dermatomicoses em bovinos.

Por seu valor nutricional, o leite representa grande fator de economia popular, em nosso meio, mormente quanto à alimentação infantil em todas as escalas sociais. Assim sendo, nossas observações, no presente estudo, visaram fornecer subsídios que permitam, a curto prazo e em nossas condições de campo, diminuir os prejuízos provocados pelas mastites quanto à quebra da produção como consequência das lesões e alterações no tecido glandular (atrofias, fibrosamentos, etc.), bem como diminuir os gastos com tratamentos comprovadamente inúteis, e muitas vezes não justificados, à base de antibióticos e anti-inflamatórios diversos, que chegam mesmo a dificultar as reações celulares locais, conforme comunicado recente por NICKERSON et al. (1986).

Procurou-se, assim, avaliar o efeito das inoculações de imunógenos no aumento das imunoglobulinas do leite e do soro sanguíneo de vacas leiteiras, e o consequente controle da mastite, sem a utilização de antibióticos e anti-inflamatórios.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba, do Instituto de Zootecnia, Estado de São Paulo, no período de dezembro de 1989 a dezembro de 1990.

Foram utilizadas 28 vacas leiteiras do tipo Mantiqueira, num esquema de blocos ao acaso, com 4 tratamentos e 7 repetições: tratamento A: controle (sem aplicações de levamisole e vacina); B: aplicações de levamisole (cloridrato de levamisole - 2, 3, 5, 6 tetrahydro-6-fenil imidazol (2-1-6) monohidro-cloreto de tiazol); C: aplicações de vacina (vacina anti-piogênica) e D: aplicações de vacina + levamisole.

Os tratamentos foram distribuídos segundo a seqüência de parições previamente sorteada (quadro 1), usando vacas entre a 3ª e 10ª lactações.

Quadro 1. Seqüência de parições.

Blocos	Tratamentos			
	A	B	C	D
I	1ª (7)*	3ª (5)	2ª (7)	4ª (7)
II	7ª (3)	6ª (3)	8ª (3)	5ª (5)
III	10ª (4)	12ª (3)	9ª (4)	11ª (6)
IV	16ª (4)	13ª (4)	15ª (6)	14ª (6)
V	17ª (5)	19ª (5)	18ª (7)	20ª (7)
VI	23ª (6)	22ª (6)	24ª (8)	21ª (9)
VII	26ª (6)	28ª (9)	25ª (6)	27ª (9)

(*). Os números entre parênteses referem-se à ordem de lactação.

Os animais experimentais permaneceram sob as mesmas condições de manejo e alimentação, em regime semi-estabulado, com controle zootécnico completo, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, sem a presença do bezerro.

Todos os bovinos tiveram assistência técnica veterinária permanente, recebendo vermífugo à base de Parabendazol, para não interferir nos efeitos dos tratamentos.

Amostragem: diariamente, no início de cada ordenha, era procedida a prova de mastite clínica com caneco de fundo preto. Semanalmente era efetuada a prova CMT; após a prova, eram coletadas, em vidros esterelizados e com as precauções higiênicas, amostras dos leites de cada quarto, em duplicata, para análises bioquímicas e microbiológicas. Tais amostras eram colocadas em caixas de isopor, imediatamente refrigeradas e encaminhadas aos laboratórios dentro de 24 horas.

O leite conjunto do estábulo era submetido, periodicamente, ao teste de redutase do azul do metileno, para determinar suas condições higiênicas e grau de contaminação.

Após a ordenha os animais experimentais eram submetidos a minucioso exame clínico, quando se procuravam sinais de inflamação nas glândulas e gânglios retro-mamários, por palpação e inspeção, alterações nos meatos galactóforos externos, na forma e consistência do úbere, bem como a presença de fibrosamentos, fistulas, etc.

Só foram incluídos, nos tratamentos, animais negativos ao teste de CMT aos 21 dias após o parto e com úberes clinicamente sadios.

Foram coletadas, no transcorrer do experimento, o número de amostras, com os exames respectivos mostrados no quadro 2.

O estudo acompanhou uma lactação inteira, que foi dividida em três períodos, para efeito de coleta de dados, sendo que a unidade experimental considerada foi o úbere. Foi coletado e analisado individualmente o leite de cada quarto mamário. Tirando-se a média para se ter dados da unidade experimental, o úbere.

Quadro 2. Amostras coletadas e exames laboratoriais.

Tratamentos	Sangue	Amostras Colostro	Leite	Exames de Campo		pH	Exames de Laboratório		
				CMT	Redutasse		Bioq.	Hemo	Micro
A	40	40	160	160	160	160	150	40	25
B	40	40	160	160	160	160	150	40	25
C	40	40	160	160	160	160	150	40	30
D	40	40	160	160	160	160	150	40	60
Totais	160	160	640	640	640	640	600	160	140

As coletas de amostras para análises laboratoriais bem como as aplicações dos produtos dos tratamentos B, C e D, seguiram o seguinte esquema:

- 1) Dia do parto - Coleta de sangue e colostro;
- 2) 21 dias pós-parto, após CMT negativo - coleta de sangue e leite. Aplicação dos produtos.
- 3) 35 dias pós-parto - coleta de sangue e leite. Aplicação dos produtos.
- 4) 49 dias pós-parto - coleta de sangue e leite. Aplicação dos produtos.
- 5) 182 dias pós-parto - coleta de sangue e leite. Aplicação dos produtos.
- 6) 301 dias pós-parto - Coleta de sangue e leite.

Análises laboratoriais:

1) Dosagens de imunoglobulinas, tanto do soro sanguíneo como do leite dos animais dos 4 tratamentos experimentais, seguiram a técnica recomendada por McEWAN et al. (1970). Nas dosagens das diversas frações antigênicas utilizou-se a técnica da precipitação fracionada pelo sulfato de amônio.

As leituras turbidimétricas foram efetuadas em espectro-fotometro digital marca Micronal, modelo B34211.

2) Hematologia: foram utilizadas análises complementares hematológicas nos animais experimentais, com determinação das contagens de leucócitos, (Aparelho Cell-crit mod. 920-A15 ROYCO).

3) Exames microbiológicos: As amostras de leite, com resultados de CMT positivas, foram submetidas à lacto-cultura, para determinação de sua flora patológica, nos laboratórios do Instituto Biológico - São Paulo, para onde eram encaminhadas sob refrigeração, procedendo-se à bacterioscopia prévia, pela coloração do Gram, etc., seguindo técnicas padronizadas (BAKER, 1970).

4) Análises bioquímicas: foram realizadas no soro sanguíneo e leite para dosagens de proteínas totais e

albumina em todos os animais experimentais. (MEDWAY et al. 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Produção Leiteira

O quadro 3 mostra os dados de produção leiteira, segundo os tratamentos, nos diversos períodos em que foi dividida a lactação estudada.

Quadro 3. Produção leiteira durante o experimento em função dos tratamentos e períodos de lactação.

Tratamentos	Períodos de lactação			Médias
	1ª	2ª	3ª	
	kg			
A	3.208,6	6.343,0	8.116,3	5.889,30
B	4.261,0	7.057,8	8.072,7	6.463,83
C	3.318,2	6.221,1	7.319,6	5.619,63
D	3.354,8	6.900,1	8.316,8	6.190,56
Médias	3.535,65	6.630,50	7.956,35	6.040,83

Trat.: F=ns
s(média)= ± 250,8 kg

Observa-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, com um coeficiente de variação de 29,1%.

2. Exames clínicos, provas de redutase, leituras de pH, exames microbiológicos e califórnia mastitis test.

Nenhum animal experimental apresentou mastite clínica durante o período observado. Os testes de redutase do azul de metileno dos leites de quartos individuais apresentaram sempre tempo de decoloramento acima de 5 horas, satisfazendo, portanto, o padrão para o leite tipo "A" (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, SIPA, 1984)*. As leituras de pH desses mesmos leites, realizadas com pH metro de bolso Corning modelo PS-15, indicaram sempre faixa de normalidade fisiológica (pH entre 6,5 a 6,7) durante todo o período do experimento.

Os exames microbiológicos, repetidos em todos os casos de reações positivas ao CMT, não detectaram ocorrência de organismos patogênicos, o que vem confirmar os achados de CUNHA et al. (1988a, 1988b), que, analisando exaustivamente 140 amostras de leite de granja tipo "B", encontrou animais com úberes sadios

* Informação Pessoal.

fortemente positivos ao CMT (grau 3) e que podiam ser diferenciados das reações com mastite pela qualificação dos tipos celulares predominantes, distinguindo, de forma evidente, a glândula sadia da enferma.

Analisando as reações dos testes de CMT nos diversos tratamentos, pelos quadrados mínimos, concluiu-se que a intensidade das mesmas sofreu aumento linear em relação aos períodos da lactação, conforme demonstra a equação de regressão $Y = 0,1223 + 0,1057X$, onde X= mês e Y= CMT.

Tais achados concordam com os comunicados de DOHOO e MEEK (1982) e CUNHA et al. (1988a), entre outros. Entretanto não foram significativas as diferenças encontradas entre os diversos tratamentos.

3. Leucometria

No quadro 4 são mostradas as contagens de leucócitos durante o período experimental. Não foram significativas as diferenças entre os tratamentos, verificando assim que as inoculações de vacina e levamisole não provocaram resposta imunitária evidente nos animais.

Quadro 4. Porcentagens de proteínas totais, albumina, globulinas e constagens de leucócitos no sangue.

Tratamentos	Proteínas totais	g%		
		Albumina	Globulinas	Leucócitos
A	9,2	4,4	4,7	9.204
B	9,1	4,4	4,6	7.793
C	8,1	4,0	4,3	8.511
D	9,3	4,8	4,5	7.668
F	13,3*	n.s.	n.s.	n.s.
s(média)	0,2	0,2	0,3	920
C.V.	4,4%	10,2%	12,1%	24,2%

4. Proteínas totais, albumina e globulinas séricas e lácticas.

Nos quadros 4 e 5 são apresentadas as médias das dosagens de proteínas totais, albumina e globulinas no sangue e leite.

Quadro 5. Porcentagens de proteínas totais, albumina e globulinas no leite.

Tratamentos	Proteína totais	g%	
		Albumina	Globulinas
A	9,9	3,0	6,9
B	9,8	2,6	7,2
C	8,7	2,4	6,2
D	10,0	3,1	6,9
F	n.s.	n.s.	n.s.
s(média)	0,7	0,3	0,6
C.V.	16,1%	23,8%	20,1%

Não foram significativas as diferenças entre os tratamentos para as dosagens de albumina no sangue e proteínas totais e albumina no leite. Os coeficientes de variação foram 10,2%, 16,1% e 23,8% para albumina (sangue), proteína e albumina (leite) respectivamente.

As dosagens de proteínas totais do sangue foram significativamente diferentes do tratamento "C" para os demais, apresentando aquele o menor teor. O coeficiente de variação foi igual a 4,4%.

A curva apresentada na figura 1 mostra o aumento da leucometria em relação aos sucessivos períodos da lactação.

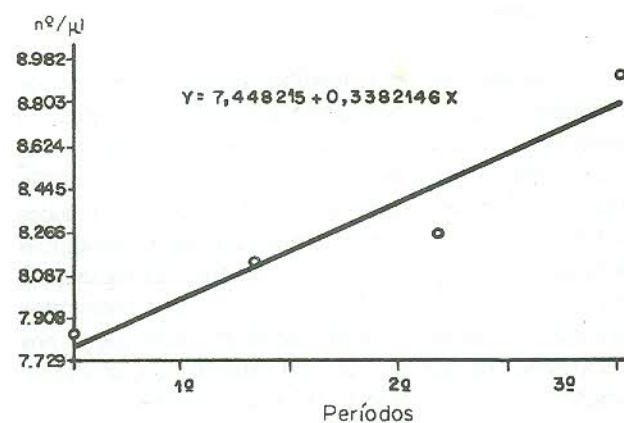


Figura 1. Contagem de leucócitos em função dos períodos de lactação.

As curvas apresentadas nas figuras 2 e 3 indicam aumento nas dosagens de globulinas séricas e lácticas durante os períodos de lactação.

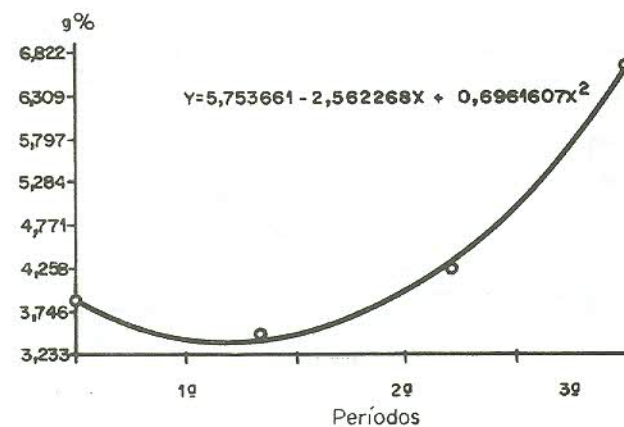


Figura 2. Dosagens de globulinas séricas em função dos períodos de lactação.

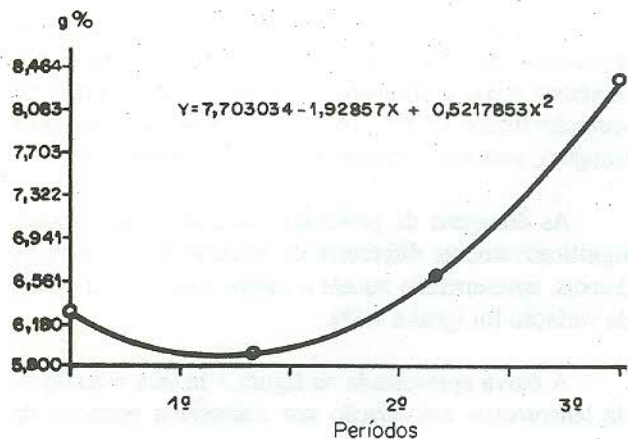


Figura 3. Dosagens das proteínas séricas em função dos períodos de lactação.

Considerando-se os resultados dos exames clínicos e sanitários que evidenciaram ausência de mastite ou infecções, o aumento, com o avanço da lactação, na leucometria e nas imunoglobulinas representa a reação fisiológica normal e imunológica refletindo-se nas reações do CMT, que em lugar de serem consideradas patológicas poderiam ser interpretadas como benéficas ao organismo, devido à infiltração do úbere sadio por elementos figurados do sangue e suas secreções, cujo papel nos mecanismos de defesa está bem estabelecido, conforme citações de TARGOWSKI (1983) e NICKERSON et al. (1986).

As curvas apresentadas nas figuras 4 e 5 indicam que as dosagens de proteínas séricas e lácticas tem tendência a aumentar nos sucessivos períodos da lactação, devido, principalmente à idade dos animais.

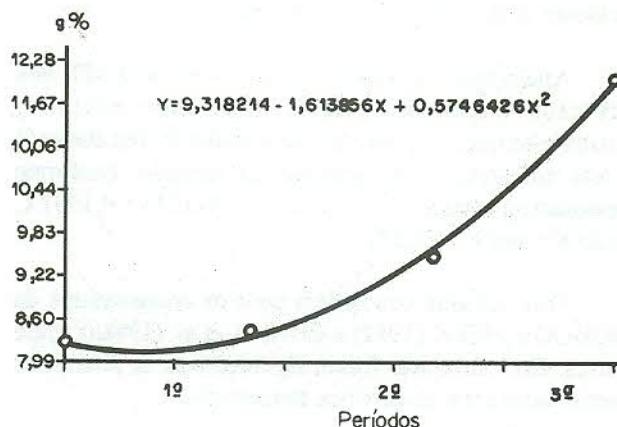


Figura 5. Dosagens das proteínas lácticas em função dos períodos de lactação.

A curva apresentada na figura 6 mostra que as dosagens de albumina sérica decresceram nos sucessivos períodos da lactação. Isto, de acordo com BACILA (1980), está ligado à sintetização contínua da lactose pelos alvéolos mamários, a partir dos precursores sanguíneos.

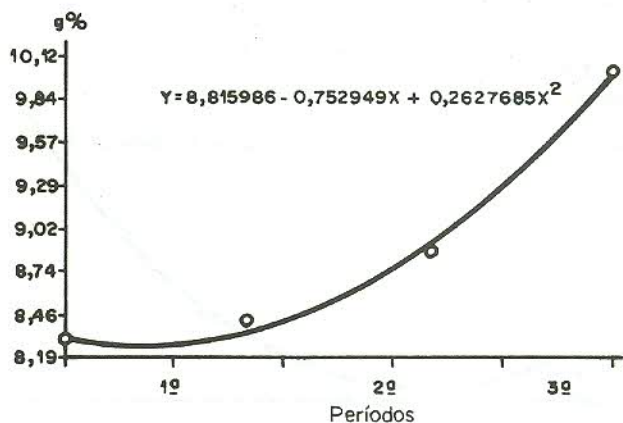


Figura 4. Dosagens da proteínas séricas em função dos períodos de lactação.

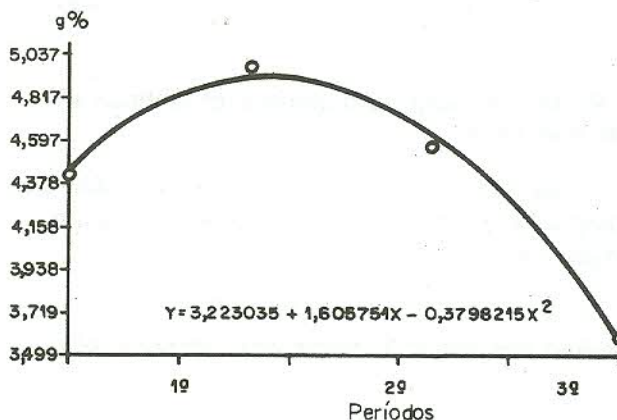


Figura 6. Dosagem da albumina sérica em função dos períodos de lactação.

A curva apresentada na figura 7 indica um crescimento linear das dosagens de albumina láctica durante os períodos da lactação.

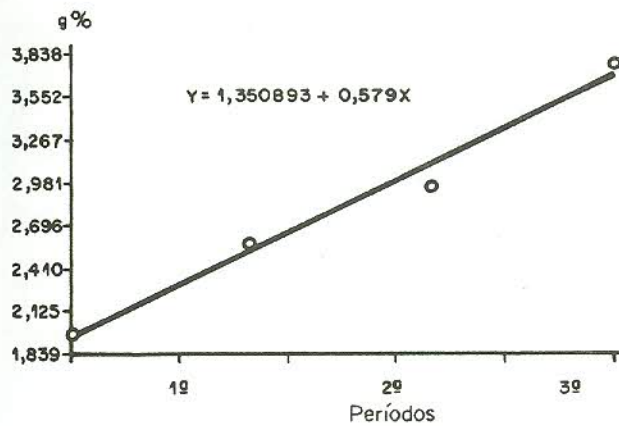


Figura 7. Dosagens da albumina láctica em função dos períodos de lactação.

CONCLUSÕES

1. A produção leiteira não foi afetada pelos tratamentos.
2. Os testes de CMT e Leucometria sofreram aumento linear em relação aos períodos da lactação, porém os exames microbiológicos não evidenciaram presença da mastite nas glândulas mamárias.
3. As dosagens de imunoglobulinas durante os períodos de lactação foram crescentes.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários João Marques da Silva, Laudelina S. dos Santos, Sebastião Carlos da Silva, Claudomira dos Santos, José Antonio S. de Oliveira e Miguel S. Cabral, pelo auxílio na preparação do material e coleta dos dados. À Agente de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica Arlete Duarte pelo auxílio e datilografia do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACILA, M. *Bioquímica Veterinária*. 1ª ed. São Paulo, J.M. Varela livros Ltda., 1980. 534p.
- BAKER, F.J. *Manual de técnica Bacteriológica*. 2ª ed. Zaragoza, Acribia, 1970. 510p.
- BELLANTI, J.A. *Imunologia: noções básicas*. Trad. por Carlos Augusto d'Avila Pacca e Ana Maria de Andrade. 1ª ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981. 263p.
- BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A. & RADOSTITS, O.M. *Clínica Veterinária*. Trad. por Ana Maria Pinto Quintanilha. 5ª ed. Rio de Janeiro, Koogan, 1983. 1121p.
- BLOSSER, T.H. Economic losses from and the national research program on mastitis in the United States. *J. dairy Sci.*, Champaign, IL, 62(1):119-27, 1979.
- CUNHA, M.S.; COSTA, E.O.; ARAUJO, W.P.; CARVALHO, V.M.; RAMOS, M.C.C. & D'ANGELINO, J.L. Contagem padrão entre placas em amostras de leite de vacas da raça Holandesa Preta e Branca sadias (em diferentes fases da lactação e ordenha) e com mamite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, Salvador, 1988. Anais... Salvador, 1988. n.226.
- _____; D'ANGELINO, J.L.; FEITOSA, F.L.F.; PAIVA, A.M.M.; SILVA, M.A.Z. & BIRGEL, E.M. Influência das fases da lactação, fases de ordenha e dos processos inflamatórios da glândula mamária na composição celular do leite de vacas da raça Holandesa Preta e Branca, objetivando o diagnóstico clínico das mastites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, Salvador, Anais... Salvador, 1988. n.58.
- DODD, F.H. Mastitis-progress on control. *J. Dairy Sci.*, Champaign, IL, 66(8):1773-80, 1983.
- DOHOO, I.R. & MEEK, A.H. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.*, Ottawa, Ont., 23(4):119-25, 1982.
- FERREIRO, L.; SOUZA, E.P.L.de & NOVY, E.F. Influência da mastite bovina subclínica na produção de leite de gado mestiço. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 7:135-43, 1979.
- McEWAN, A.D., FISHER, E.W., SELMAN, I.E., PENHALE, W.J. A turbidity test for the stimation of immunoglobulin levels in neonatal call serum. *Chin. Chim. Acta*, s.l.p. 27:155-63, 1970.
- MEDWAY, W.; PRIER, J.E. & WILKINSON, J.S. *Patologia clínica Veterinária*. Trad. por Hedberto Ruiz Skewes e Jorge Spinola Cauton., Uteha, 1973. 532p.
- NICKERSON, S.C.; PAAPE, M.J.; HARMON, R.J. & ZIV, G. Mammary leucocyte response to drug therapy. *J. Dairy Sci.*, Champaign, IL, 69(6):1733-42, 1986.
- RENOUX, G. & RENOUX, M. Stimulation of anti-brucella vaccination in mice by tetramisol, a phenylimidothiazole salt. *Infect. Immun.*, Washington, 8:544-48, 1973.
- _____ & _____. Modulation of imune reativity by phenylimidothiazole salts in mice immunized by sheep red blood cells. *J. Immunol. Baltimore, MD.*, 113:779-90, 1974.
- SIQUEIRA, P.A. Ação imuno-estimulante inespecífica de levamisole no tratamento de dermatomicose. *Zootecnia. Nova Odessa, SP*, 25(2):175-79, 1987.
- SMITH, K.L. Mastitis Control. A Discussion. *J. Dairy Sci. Champaign, IL.*, 66(8):1790-94, 1983.
- TARGOWSKI, S.P. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J. Dairy Sci. Champaign, IL.*, 66(8):1781-89, 1983.
- WILSON, C.D. Subclinical staphylococcal infection causes the greatest losses in Britain. *Vet. Rec. London*, 73:1019, 1961.