

KARINA MEDICI MADUREIRA

**Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras
híidas criadas no Estado de São Paulo**

São Paulo
2006

KARINA MEDICI MADUREIRA

**Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras
híidas criadas no Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Elbe
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
4/1/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1627
FMVZ

Madureira, Karina Medici

Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo / Karina Medici Madureira. – São Paulo : K. M. Madureira, 2006.

96 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo.

1. Leite. 2. Sangue. 3. Células. 4. Caprinos. 5. Leucócitos.
I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

P A R E C E R

Interessado: Karina Medici Madureira

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 827/2006, intitulado: "Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híbridas criadas no Estado de São Paulo", no qual foram utilizados 100 (cem) cabras (*Capra hircus*), sob responsabilidade do Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 04 de janeiro de 2006

Prof. Dr.  Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MADUREIRA, Karina Medici

Título: Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híbridas criadas no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

“A coragem nunca foi uma questão de músculos;
ela é uma questão de coração.
O músculo mais duro treme diante de um medo imaginário.
Foi o coração que pôs o músculo a tremer”.
Mahatma Gandhi

Este trabalho é dedicado à minha amada família e a todos os meus verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo, pela confiança, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Maurício Garcia, principal responsável da minha paixão por pesquisa.

A Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, incentivadora, amiga, parceira, conselheira.

Aos Professores Dr. Fernando José Benesi, Dr. Eduardo Harry Birgel, Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, Dr. Enrico Lippi Ortolani, Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Dra. Lílian Gregory pelas palavras sábias e ensinamentos desde minha entrada ao Departamento.

Aos Profs. do Departamento de Clínica Médica: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Prof. Dr. Cássio Xavier de Mendonça Júnior, Profa. Dra. Márcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas e Profa. Dra. Maria Cláudia A. Sucupira Magalhães.

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Castro, pelo fornecimento do Kit de imunodifusão.

A Regina Mieko Sakata Mirandola, pela dedicação e paciência durante o treinamento laboratorial.

A amiga Viviani Gomes, braço direito indispensável nesta pesquisa.

A amiga Sandra Satiko Kitamura, pela paciência nos vários telefonemas esclarecendo as dúvidas da estatística.

As amigas Érica Minematsu e Talita Andreonni, pela ajuda nas colheitas e momentos de risadas.

Ao proprietário do Capril Granja União; Sr. Wilson, proprietário do capril Solaris; Sr. Jaime, aos funcionários do Capril Tabor; Paulo e Ademir, ao Sr. Oliveira.

Aos funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes da FMVZ/USP: Luizinho, Elias, Edson e Miguel.

A Claudia Regina Stricagnolo, pela ajuda nos exames bacteriológicos e ensinamentos técnicos.

Aos técnicos do laboratório de Histologia do Departamento de Patologia Veterinária, Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho, pelo auxílio na conservação das lâminas.

A Marli, Clara, Maria Luíza, Carmen, Creide, Edna, sempre prontas para ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ/USP, sempre me atendendo com boa educação e profissionalismo.

As secretárias do departamento: Maria Aparecida, Patrícia, Daura.

A secretária da pós-graduação Adelaide Borges.

Aos pós-graduandos: Alexandre, Andréa Parra, Andréa Rosenfeld, Camila, Carla, Clarisse, Fernanda Biojone, Heloísa, Huber, João Paulo, Lílian, Lúcia, Maiara, Marta, Paulo (*in memoriam*), Pierre, Regiane, Ricardo, Rinaldo, Ribeiro e Rogério pela ajuda e amizade desde a época da residência.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Usp, que permitiu a realização deste trabalho.

A Fapesp, pela concessão de uma bolsa de mestrado (02/11155-0) e financiamento do projeto (03/08214-8).

RESUMO

MADUREIRA, K. M. **Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo.** [Total and differential cellular count in milk and blood from healthy goats bred in Sao Paulo state]. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A presente investigação teve o objetivo de avaliar quantitativa e qualitativamente a celularidade de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo, assim como correlacionar as células somáticas do leite com os leucócitos presentes no sangue, informações que, além de raras em relação à glândula mamária de cabras sadias, são extremamente conflitantes. Foram colhidas amostras de cada metade mamária, provenientes de 51 cabras híidas das raças Saanen, Alpina e Toggenburg, em diferentes fases de lactação, pertencentes a diferentes criatórios do Estado de São Paulo. As amostras de leite foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT), a contagem eletrônica de células somáticas e microscopia direta, utilizando o corante de verde de metil e pironina-Y, além da citocentrifugação para a avaliação dos leucócitos; com as amostras de sangue foi realizado o leucograma. Associando-se os escores do CMT com a contagem celular eletrônica foram encontrados os valores medianos de 181.000, 578.000, 628.000, 1.421.500 e 5.542.000, respectivamente. Já na contagem celular por microscopia direta os valores medianos obtidos foram de 74.991, 271.396, 71.420, 640.995 e 5.049.394, correspondendo, respectivamente aos escores negativo, traços, 1+, 2+ e 3+. Relacionando-se as contagens celulares de acordo com as fases da lactação, os valores medianos obtidos não apresentaram diferenças significativas entre as fases inicial, intermediária e final da lactação tanto para a contagem eletrônica quanto para a contagem microscópica direta,

respectivamente. A correlação entre a contagem celular automática e microscópica direta foi de 88%. Não foram encontradas diferenças significativas quando se comparou a contagem de células somáticas nas glândulas direita e esquerda, tanto na contagem automática quanto na microscópica direta. Os valores relativos dos leucócitos presentes no leite foram determinados, obtendo-se os valores médios e desvios-padrão de $77,0 \pm 30,5\%$; $76,5 \pm 20,9\%$ e $65,3 \pm 25,6\%$ de neutrófilos, $2,24 \pm 3,26\%$; $2,04 \pm 2,33\%$ e $2,14 \pm 2,81\%$ de linfócitos e $22,6 \pm 20,2\%$, $21,4 \pm 20,0\%$ e $23,0 \pm 16,2\%$ de monócitos, correspondendo às fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente. No sangue, determinou-se o valor total de leucócitos, obtendo-se o valor médio de 8525 ± 3244 células/mL. Os valores relativos médios dos diferentes tipos de leucócitos presentes no sangue de cabras sadias foram de $56,8 \pm 11,8\%$ de neutrófilos, $38,5 \pm 11,8\%$ de linfócitos, $2,8 \pm 1,7\%$ de monócitos e $1,9 \pm 1,6\%$ de eosinófilos. Correlacionando-se os leucócitos presentes no sangue com os presentes no leite, não foram observadas correlações significativas, porém, quando se analisou os leucócitos do sangue com as fases da lactação, foram encontradas diferenças significativas nos valores relativos médios de neutrófilos e linfócitos, respectivamente, na fase final da lactação. Os resultados obtidos permitiram concluir que existiu diferença entre a contagem celular automática e a microscópica direta na determinação do número de células somáticas no leite caprino; os valores celulares aumentam conforme o escore do CMT, o leucócito predominante no leite e sangue de cabras híidas é o neutrófilo e existe relação íntima entre o neutrófilo e o linfócito no sangue de cabras, sendo estes influenciados pela fase da lactação.

Palavras-chave: Leite. Sangue. Células. Caprinos. Leucócitos.

ABSTRACT

MADUREIRA, K.M. **Total and differential cellular count in milk and blood from healthy goats bred in Sao Paulo state.** [Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo]. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The present investigation had the objective to evaluate quantitatively and qualitatively the cellularity of created healthy goats in Sao Paulo state, as well as correlating the somatic cells of milk with the leukocytes in the blood, information that, beyond rare in relation to the mammary gland of healthy goats, are extremely conflicting. Samples of each mammary half had been harvested, proceeding from 51 Saanen, Alpina and Toggenburg healthy goats, in different phases of lactation, from the different breeders of Sao Paulo state. The milk samples had been submitted to California Mastitis Test (CMT), the electronic counting of somatic cells and direct microscopy, using the pyronin Y-methyl green stain, beyond the cytopsin centrifuge for the evaluation of leukocytes; with the samples of blood the leucogram was carried through. Associating you prop up of the CMT with electronic the cellular counting had been found the medium values of 181.000, 578.000, 628.000, 1.421.500 and 5.542.000, respectively. Already in the cellular counting for direct microscopy the gotten medium values had been of 74.991, 271,396, 71,420, 640,995 and 5.049.394, corresponding, respectively to negative, traces, 1+, 2+ and 3+ scores. Becoming related the cellular counting in accordance with the phases of the lactation; the gotten medium values had not presented significant differences between the phases, initial, intermediate and final of the lactation in such for the electronic counting how much for the direct microscopically counting, respectively. The correlation between the

automatic and direct microscopically counting cellular was of 88%. Significant differences had not been found when the counting of somatic cells in the glands was compared right and left, as much in the microscopically automatic counting in the direct one. The relative values of the leucocytes gifts in milk had been determined, getting the average values and $77,0 \pm 30,5\%$; $76,5 \pm 20,9\%$ and $65,3 \pm 25,6\%$ of neutrophils, $2,24 \pm 3,26\%$; $2,04 \pm 2,33\%$ and $2,14 \pm 2,81\%$ of lymphocytes and $22,6 \pm 20,2\%$, $21,4 \pm 20,0\%$ and $23,0 \pm 16,2\%$ of monocytes, corresponding the phases initial, intermediate and final of the lactation, respectively. In the blood, the total value of leucocytes was determined, getting itself the average value of 8525 ± 3244 céls/mL. The average relative values of the different types of leukocytes gifts in the blood of healthy goats had been of $56,8 \pm 11,8\%$ of neutrophils, $38,5 \pm 11,8\%$ of lymphocytes, $2,8 \pm 1,7\%$ of monocytes and $1,9 \pm 1,6\%$ of eosinophils. Correlating the leukocytes gifts in the blood with the gifts in milk, significant correlation had not been observed, however, when it analyzed the leucocytes of the blood with the phases of the lactation, significant differences in the average relative values of neutrophils and lymphocytes had been found, respectively, in the final phase of lactation. The gotten results allow to conclude that difference between the automatic cellular counting and the direct microscopically one in the determination of the somatic frame number in goat milk exists, the cellular values increase as prop up it of the CMT, the predominant leucocyte in milk and blood of healthy goats is neutrophil, exists close relation between neutrophil and lymphocytes in the blood of goats, being these influenced by the phase of the lactation.

Key-words: Milk. Blood. Cells. Goat. Leucocytes.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Relação entre a intensidade da reação ao *California Mastitis Test* (CMT) e o valor médio da contagem de células somáticas (CCS) do leite de cabras, segundo Schalm et al. (1971)..... 27
- Quadro 2 - Interpretação da prova *California Mastitis Test* (CMT), segundo Schalm, Carrol e Jain (1971) 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de amostras e respectivas porcentagens de acordo com os escores da prova do Califórnia Mastitis Test (CMT) no leite de cabras sadias – São Paulo –2005	50
Tabela 2 -	Valores medianos das contagens de células somáticas, realizadas através de contador automático e microscopia direta, de acordo com os diferentes escores do CMT, no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005	52
Tabela 3 -	Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras sadias, realizadas através de contador automático e microscopia direta, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005	54
Tabela 4 -	Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras sadias, realizadas através de contador automático e microscopia direta – São Paulo – 2005	56
Tabela 5 -	Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite, realizadas através de contador automático e microscopia direta, nas glândulas mamárias direita e esquerda de cabras sadias - São Paulo - 2005.....	58
Tabela 6 -	Valores relativos (médias e desvios-padrão) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite de cabras sadias, obtidos através da citocentrifugação, nas glândulas mamárias direita e esquerda – São Paulo – 2005	60
Tabela 7 -	Valores relativos (médias e desvios-padrão) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite de cabras sadias, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005	62
Tabela 8 -	Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos presentes no sangue de cabras sadias – São Paulo – 2005.....	64
Tabela 9 -	Valores absolutos dos leucócitos totais encontrados no sangue de cabras sadias, nas diferentes fases de lactação – São Paulo – 2005.....	66
Tabela 10 -	Médias e desvios-padrão dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias de acordo com as fases da lactação – São Paulo – 2005	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Porcentagens de amostras de acordo com os escores da prova do Califórnia Mastitis Test (CMT) no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005 51
- Figura 2 - Mediana da contagem automática de células somáticas ($\times 10^5$ células/mL) conforme as reações do CMT no leite de cabras sadias – São Paulo – 2005 52
- Figura 3 - Mediana da contagem microscópica direta de células somáticas ($\times 10^5$ células/mL) conforme as reações do CMT no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005 53
- Figura 4 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS), realizada através de contador automático, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005 54
- Figura 5 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS) realizada através de contagem microscópica direta, nas diferentes fases da lactação – São Paulo - 2005 55
- Figura 6 - Valores medianos das contagens de células somáticas realizadas através de contador automático e microscopia direta – São Paulo - 2005 56
- Figura 7 - Correlação entre a CCS automática e microscópica direta – São Paulo – 2005 57
- Figura 8 - Fotomicrografia de células somáticas coradas com verde de metil e pironina-Y, presentes no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005 57
- Figura 9 - Valores medianos das contagens de células somáticas nas glândulas direita e esquerda de cabras sadias– São Paulo - 2005 59
- Figura 10 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos presentes na glândula mamária direita de cabras sadias – São Paulo - 2005 60
- Figura 11 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos presentes na glândula mamária esquerda de cabras sadias – São Paulo – 2005 61

Figura 12 - Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos presentes no leite de cabras sadias, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005	62
Figura 13 - Fotomicrografia de um neutrófilo (esquerda) e um macrófago (direita) obtidos através da citocentrifugação, presentes no leite de cabras sadias – São Paulo – 2005	63
Figura 14 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias – São Paulo – 2005	64
Figura 15 - Valores absolutos de leucócitos totais no sangue de cabras sadias de acordo com as diferentes fases da lactação – São Paulo - 2005.....	66
Figura 16 - Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias, de acordo com as diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
CMT	<i>Califórnia Mastitis Test</i>
Cel	célula
cm ²	centímetros quadrados
r	coeficiente de correlação
pH	concentração hidrogeniônica
CCS	contagem de células somáticas
FCR	força centrífuga relativa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	grama
g	gravidade
°C	grau Celsius
IDGA	imunodifusão em gel de ágar
L	litro
>	maior
®	marca registrada
µL	microlitro
mg	miligramas
mL	mililitro
mm	milímetros
p	nível de significância
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
PBS	solução salina tamponada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	TIPOS CELULARES DO LEITE DE CABRAS	22
1.2	RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	24
1.3	MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR A RESPOSTA INFLAMATÓRIA	25
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	CATEGORIZAÇÃO AMOSTRAL E ANIMAIS UTILIZADOS.....	35
3.2	SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS E CATEGORIZAÇÃO DAS FASES DE LACTAÇÃO	36
3.3	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	37
3.4	REALIZAÇÃO DA PROVA DO CMT	38
3.5	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LEITE	39
3.6	ANÁLISE DAS AMOSTRAS	40
3.6.1	Contagem Celular Automática	41
3.6.2	Contagem Celular por Microscopia Direta.....	41
3.6.3	Contagem diferencial de leucócitos no leite	42
3.6.4	Exame Microbiológico do leite	43
3.6.5	Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue	44

3.6.6	Teste de imunodifusão em agar gel para detecção de anticorpos anti-vírus da Artrite Encefalite Caprina – IDGA/CAE.....	45
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS	50
5.1	CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT)	50
5.2	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) SEGUNDO OS ESCORES DO CMT	51
5.3	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS SEGUNDO AS FASES DA LACTAÇÃO	53
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS ATRAVÉS DE CONTADOR AUTOMÁTICO E CONTAGEM MICROSCÓPICA DIRETA (COLORAÇÃO DE VERDE DE METIL E PIRONINA-Y).....	55
5.5	RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E AS MÉTANES MAMÁRIAS	58
5.6	LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE	59
5.7	LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE	63
5.8	RELAÇÃO ENTRE OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE COM OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE	65
6	DISCUSSÃO	69
6.1	CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT)	69
6.2	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS).....	70
6.3	LEUCÓCITOS NO LEITE	75
6.4	LEUCÓCITOS NO SANGUE	77
6.5	RELAÇÃO ENTRE OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE COM OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE	78

7	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

O leite de cabra vem se destacando no mercado de laticínios devido ao seu alto valor nutritivo, podendo ser utilizado por crianças e idosos, por apresentar alta digestibilidade (Barros; Leitão, 1992; Furtado, 1981), além disso, pode ser um substituto do leite de vacas na dieta de muitos indivíduos, quando estes são alérgicos ou apresentam incompatibilidade com o leite de vacas (DEVENDRA; BURNS, 1983).

Durante o período de 1980 a 1992 observou-se um aumento de 51,6% na produção nacional de leite de cabras (FAO, 1993), indicando um crescente interesse na atividade. Tal incremento produtivo deve-se a introdução de melhores tecnologias pelos profissionais e empresários envolvidos com a caprinocultura leiteira. A população caprina no Brasil, está estimada, em aproximadamente 9.581.653 cabeças, segundo dados do IBGE (2003), porém, a mamite, processo inflamatório da glândula mamária, pode representar um obstáculo a este incremento produtivo.

A mamite é responsável por prejuízos econômicos conseqüentes ao descarte do leite; gastos com medicamentos, assistência veterinária e mão de obra; redução na quantidade e qualidade do leite e derivados lácteos (Barros; Leitão, 1992; DeGraves; Fetrow, 1993; Dulin et al., 1983; Lewter et al., 1984). Além disto, o leite contaminado pode veicular agentes microbianos aos humanos, tornando-se um problema à saúde pública (BLOOD; HENDERSON, 1978; RADOSTITIS; LESLIE; FETROW, 1994).

A mamite pode ser diagnosticada através do exame clínico do animal acometido, inclusive pelos métodos que avaliam a celularidade do leite, pois uma

das importantes respostas frente à doença é caracterizada pelo aumento do número de leucócitos na glândula mamária provenientes da circulação sanguínea (PAAPE; HAFS; SNYDER, 1963). A migração ocorre através da estimulação epitelial por patógenos, com os leucócitos atravessando os capilares venosos até atingirem o epitélio mamário (RAINARD; RIOLLET, 2004). O neutrófilo é o primeiro leucócito a alcançar a mama, porém, os valores no sangue rapidamente são compensados, através da presença de neutrófilos jovens na circulação (GUIDRY, PAAPE, PEARSON, 1976), existindo desta maneira, um perfeito equilíbrio entre os leucócitos do leite e do sangue (JAIN, 1986).

1.1 TIPOS CELULARES DO LEITE DE CABRAS

A glândula mamária das cabras é composta por ácinos, constituídos de células epiteliais. Durante a secreção láctea do tipo apócrina, diferente da secreção merócrina da vaca (Dulin; Paape; Weinland, 1982; Perrin; Baudry, 1993), a porção distal das células epiteliais alveolares separa-se de sua base e é eliminada no lúmen dos ácinos sob a forma de partículas citoplasmáticas, de tamanhos variáveis, normalmente grandes, de 5-30 μ m, cujas dimensões e morfologia são semelhantes aos leucócitos (DULIN et al., 1983; PERRIN; BAUDRY, 1993). Essas partículas são anucleadas em sua maioria (PAAPE; CAPUCO, 1996) e seu interior é preenchido por glóbulos de gordura (PERRIN; BAUDRY, 1993). Estas partículas correspondem à cerca de 35% dos elementos celulares observados no leite de cabras (SIERRA et al., 1998) e estão ausentes no leite de vaca (Gonzalo, 1995; Park; Humphrey, 1986;

Perrin; Baudry, 1993), o que aumenta aparentemente a concentração de leucócitos no leite caprino (SILVA et al., 1996), quando não se distingue das células nucleadas (DROKE; PAAPE; DICARLO, 1993; DULIN et al., 1983; HINCKLEY, 1983). Este fato salienta a importância da padronização e adoção de técnicas de contagens celulares para esta espécie animal.

As células epiteliais representam um número relativamente constante e equivalente a 5,6% do total de células somáticas no leite de cabras (Sierra; Sanchez; Corrales, 1999; Zeng, 1996), e se originam da descamação dos diferentes epitélios que compõem a glândula mamária. Estas têm núcleo pequeno, pobre em cromatina e seu tamanho varia entre 10 a 20 μ m. Os polimorfonucleares são células de vida curta, com núcleo multilobado e citoplasma ligeiramente basófilo contendo grânulos; sendo subdivididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos são produzidos na medula, lançados na circulação e alcançam os tecidos 9 horas após sua produção, inclusive o mamário (CARLSON; KANEKO, 1975). O estímulo da mamada e ordenha induzem a migração de neutrófilos ao tecido mamário, fazendo com que o fluxo à glândula seja constante; quando chegam ao lúmen alveolar, fagocitam os glóbulos de gordura e caseína, provocando diminuição de suas propriedades bactericidas e fagocíticas, levando-os à morte, após são removidos durante a ordenha e substituídos (PAAPE; WERGIN, 1977).

Os linfócitos são células que possuem relação núcleo/citoplasma elevada, sendo importantes no mecanismo imune humoral e celular (PERRIN; BAUDRY, 1993).

Os monócitos são células grandes (20-25 μ m), de núcleo volumoso e irregular, com citoplasma abundante e ligeiramente basófilo, às vezes contém grânulos

azurrófilos; quando ativados por estruturas antigênicas, se transformam em macrófagos (PERRIN; BAUDRY, 1993; TIZARD, 2002).

1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA GLÂNDULA MAMÁRIA

Os neutrófilos e macrófagos presentes no leite exercem o mecanismo da fagocitose, impedindo a ação dos diferentes tipos de agentes causadores de infecção que podem atingir a glândula mamária. Os neutrófilos liberam produtos derivados de sua morte, como elastase e colagenase, levando à produção de fatores quimiotáticos e monocíticos, atraindo os macrófagos para o local, além da atração vinda das moléculas liberadas pelas células e tecidos lesionados.

No processo inflamatório da glândula, ou mamite, ocorre uma resposta vascular e celular dos tecidos mamários a agressão (THOMPSON, 1983) na presença de fatores determinantes, geralmente bacterianos, antecedidos ou não dos fatores predisponentes (BIRGEL, 1985).

Os microrganismos que chegam à cisterna da glândula encontram as células fagocíticas, em especial os neutrófilos e macrófagos, que no primeiro momento tentarão fagocitar as partículas estranhas (PAAPE; CAPUCO, 1996). Toxinas, enzimas e componentes da parede bacteriana estimulam a produção de mediadores químicos da inflamação, tais como histamina, serotonina e interleucinas, que juntamente com os leucócitos presentes no leite, atrairão os leucócitos da corrente sanguínea, através de mensageiros químicos ou quimiotaxia (HARMON, 1994). A migração dos neutrófilos da corrente sangüínea ao tecido mamário, através de

diapedese, é a primeira linha imunológica de defesa (PAAPE; CAPUCO, 1996). Se o agente persistir por muito tempo, outras células como os macrófagos, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos e células mononucleares, entrarão em ação, indicando lesão subaguda ou crônica (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1984; THOMPSON, 1983).

Os polimorfonucleares, com sua função fagocítica, exercem papel importante no mecanismo de defesa da glândula mamária, estando presente em maior quantidade no leite, quando comparado aos outros leucócitos (BARBOSA et al., 2001), independente do estado de higidez da glândula mamária (FERNANDES, 2002).

1.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Entre os métodos utilizados para avaliar a contagem celular, pode-se citar o California Mastitis Test (CMT), a contagem microscópica direta e a contagem eletrônica. A prova do CMT foi padronizada por Schalm e Noorlander, em 1957, e baseia-se no princípio da reação dos leucócitos com a soda associada a um agente tenso ativo aniônico, o alquilarisulfonato. Esta prova mede indiretamente a concentração de leucócitos no leite (PAAPE; HAFS; SNYDER, 1963). O mecanismo da reação baseia-se na liberação do ácido desoxirribonucléico (DNA) do núcleo das células somáticas, destruídos pela ação da soda, o qual forma cadeia complexa com o detergente aniônico, resultando em uma mistura gelatinosa (SILVA et al., 1996). A avaliação dos resultados positivos na prova do CMT é feita através da viscosidade

desenvolvida, cuja intensidade é medida em número de cruces (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Alguns trabalhos comprovaram que a celularidade está diretamente relacionada aos escores do CMT (CONTRERAS et al., 1996; ROTA et al., 1994; SCHALM; CARROL, JAIN, 1971; SILVA et al., 2001).

Em caprinos, o CMT negativo é um bom indicador da inexistência de infecções, porém um CMT positivo pode não ser indicativo de processos infecciosos da glândula mamária (LEWTER et al., 1984). Isto ocorre devido à presença das células epiteliais, em maior quantidade, quando comparada ao leite de vaca, que juntamente com leucócitos, reagem ao CMT levando a uma interpretação da prova diferente da usada em bovinos (LEWTER et al., 1984). No leite de cabras os corpúsculos citoplasmáticos são anucleados em sua maioria, não interferindo nos resultados do CMT (PETTERSEN, 1981), porém uma média de 3% destes corpúsculos contém fragmentos de núcleo (PAAPE; CAPUCO, 1996), que juntamente às células epiteliais pode elevar aparentemente a concentração de leucócitos presentes no leite, mesmo em animais hígidos.

O CMT, apesar de algumas limitações quanto ao seu uso no leite caprino, devido á celularidade ser maior que a do leite de vacas, é um método extremamente fácil de ser realizado, podendo ser usado a campo como método de triagem e seleção dos animais (CONTRERAS et al., 1996).

Schalm, Carrol e Jain (1971) interpretaram a reação do leite de cabras ao CMT e relacionaram o número de células somáticas com a intensidade da reação (Quadro 1). Os autores verificaram que cabras sem mamite podem apresentar reações traços ou 1+. Por outro lado, 2+ e 3+ podem ser importantes indicativos de inflamação intramamária. Smith e Roguinsky (1977), classificaram o leite dos

animais analisados a partir do escore 1+, animais estes livres de infecções mamárias.

Silva et al. (2001) observou uma correlação de 63% entre o Califórnia Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas, podendo o CMT ser utilizado como método de triagem da higidez da glândula mamária caprina.

CMT	CCS (células/mL)
Negativo (-)	68.000 (0-480.000)
Traços (T)	268.000 (0-630.000)
Fraco positivo (+)	800.000 (240.000-1.440.000)
Claro positivo (++)	2.560.000 (1.080.000-5.850.000)
Forte positivo (+++)	acima de 10.000.000

Fonte: Schalm, Carrol e Jain (1971)

Quadro 1 - Relação entre a intensidade da reação ao *California Mastitis Test* (CMT) e o valor médio da contagem de células somáticas (CCS) do leite de cabras, segundo Schalm, Carrol e Jain (1971)

A contagem eletrônica de células somáticas pode ser realizada por contadores de partículas (Coulter Counter) e contadores baseados em citometria de fluxo (Somacount ou Fossomatic). O primeiro método citado é inespecífico e baseia-se na contagem de impulsos elétricos criados pela passagem de partículas entre dois eletrodos e sofre influência da quantidade de glóbulos de gordura e partículas citoplasmáticas, resultando em contagens quase duas vezes maiores que as do Fossomatic ou Somacount (POUTRELL; LERONDELLE, 1983).

Os aparelhos baseados em citometria de fluxo, tipo Somacount e Fossomatic, baseia-se na contagem de núcleos celulares. Perrin e Baudry (1993) afirmaram que

apesar deste tipo de contagem não permitir a diferenciação de diferentes tipos celulares, pode ser um dos melhores métodos em uso, pois excluem a interferência dos corpúsculos citoplasmáticos anucleados presentes no leite de cabras (MANSER, 1986; PAAPE et al., 2001; SIERRA; SANCHEZ; CORRALES, 1999; ZENG, 1996;). Sabe-se que vários fatores, fisiológicos ou não, podem afetar a Contagem de Células Somáticas, tais como número de lactações, idade do animal, fase da lactação (FERNANDES, 2002; GOMES, 2003). Alguns autores ainda citam o efeito do estro (McDOUGALL; VOERMANS, 2002) e a administração de corticóides endógenos na contagem celular (GUIDRY, PAAPE. PEARSON, 1976).

A microscopia direta foi padronizada por Prescott e Breed (1910), e serve como método de controle dos contadores eletrônicos, recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration) quando associado à coloração de verde de metil pironina-Y, para diferenciar as células nucleadas dos corpúsculos citoplasmáticos (ZENG, 1999).

Vários trabalhos (Gonzalo, 1995; Poutrell; Lerondelle, 1983; Stehling et al., 1988; White; Hinckley, 1999, Dulin; Paape; Wergin, 1982) já foram conduzidos visando estabelecer o valor total de células somáticas em cabras híbridas, mas a grande variação entre os resultados, devido às diversas metodologias empregadas, ainda torna difícil estabelecer os limites de normalidade para esta espécie. Stehling et al. (1988) referem o nível de 500 mil céls/ml, utilizando diferenciação entre células nucleadas e não nucleadas, através da contagem microscópica direta, no leite de cabras criadas no Estado de Minas Gerais. Arcuri et al. (2004) encontraram os limites de $5,83 \times 10^5$ e $5,57 \times 10^5$ células/mL no leite de cabras, correspondendo, respectivamente, às contagens automática e microscópica direta.

White e Hinckley (1999) utilizaram o limiar de 1×10^6 céls/mL, analisando a celularidade das amostras através de aparelho eletrônico baseado em citometria de fluxo, mas também obtiveram 43,9% de amostras com celularidade superior a 1×10^6 cél/ml, mesmo com exame microbiológico de rotina negativo, sugerindo que infecções causadas por micoplasma, vírus da artrite encefalite caprina ou animais em fase final de lactação, podem estar relacionados às altas contagens celulares. Nord e Adnoy, (1997), encontraram 40% dos animais estudados positivos para a Artrite Encefalite Caprina, com esses mesmos animais apresentando contagens celulares no leite mais altas que nos animais negativos. O mesmo fato foi observado por Sánchez et al. (2001).

Andrade et al. (2001) determinaram a Contagem de Células Somáticas através de microscopia direta, citometria de fluxo com aparelho Somacount e Wiscosin Mastitis Test (WMT), obtendo significância entre o Somacount e a microscopia direta, enquanto que o WMT subestimou a contagem celular, por ser um método ainda não especificado para leite de cabras.

A contagem microscópica direta tem sido preconizada como um dos métodos mais confiáveis para a determinação do número de células somáticas no leite caprino, principalmente se forem utilizados corantes específicos de DNA, como o verde de metil e pironina-Y, pois diferencia as células somáticas dos corpúsculos cotiplasmáticos (ZENG et al. 1999). Barbosa et al. (2004) determinaram a contagem celular no leite de ovelhas, utilizando a contagem microscópica direta, porém, como o leite de ovelha possui um maior teor de sólidos totais, quando comparado ao leite de cabra, algumas dificuldades foram encontradas, surgindo aí a necessidade de reavaliação dos métodos de coloração para esta espécie.

A contagem diferencial de células somáticas é utilizada para análise qualitativa, estabelecendo a proporção dos diferentes tipos celulares presentes no leite, que pode estar alterada diante de diferentes estímulos, sejam eles infecciosos ou fisiológicos, porém há poucos trabalhos em caprinos, e mesmo em bovinos, que avaliaram a citologia do leite, e entre os mesmos houve grandes variações nos resultados obtidos.

Dulin, Paape e Weinland (1982) avaliaram amostras de leite de cabras sadias e obtiveram médias de 66,2; 0,4; 32,8 e 0,6% de polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, respectivamente. Perrin e Baudry (1993) estudaram a proporção celular em animais sadios e observaram os intervalos médios de 45 a 74%; 9 a 20 % e 15 a 41% de polimorfonucleares, linfócitos e monócitos, respectivamente. Barbosa et al. (2001) avaliaram a citologia do leite de oito cabras durante 16 semanas, obtendo intervalos médios de 57,9 a 88,9; 5,9 a 17,6 e 5,1 a 24,4% de granulócitos, linfócitos e macrófagos, respectivamente. Lima Júnior, Vianni e Nader Filho (1994) e Hinckley (1983), sugeriram haver alterações nestas proporções, na presença de agentes infecciosos. Assim como na contagem celular total, sabe-se que há fatores fisiológicos que interferem na análise celular qualitativa, em bovinos destaca-se fase e número de lactações, tipo, fases e período entre ordenhas.

Recentemente, em alguns poucos trabalhos nacionais e internacionais (BARBOSA et al., 2001; DAS; SINGH, 2000) avaliou-se o mecanismo celular de defesa da glândula mamária, através da contagem total e diferencial de células somáticas, relacionando-as às concentrações e tipos celulares presentes na circulação sanguínea no decorrer da lactação. Das e Singh (2000) observaram que o

número total de células somáticas apresentou correlação negativa com os neutrófilos sanguíneos.

2 OBJETIVOS

- a) avaliar quantitativamente a celularidade de amostras do leite de metades mamárias de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo, através do CMT, contador eletrônico baseado em citometria de fluxo, e contagem microscópica direta, utilizando o corante de verde de metil e pironina-Y;
- b) avaliar qualitativamente a celularidade de amostras do leite de cabras de metades mamárias de cabras híidas criadas no Estado de São Paulo, através do método de citocentrifugação;
- c) analisar a possível correlação entre a contagem total e diferencial das células somáticas do leite e dos leucócitos sanguíneos circulantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram colhidas 102 amostras de leite, provenientes das duas metades mamárias e 51 amostras de sangue, provenientes de 51 fêmeas caprinas sadias das raças Saanen, Alpina e Toggenburg, em diferentes fases de lactação, provenientes de quatro propriedades leiteiras do Estado de São Paulo.

3.1 CATEGORIZAÇÃO AMOSTRAL E ANIMAIS UTILIZADOS

Para a determinação dos animais utilizados nesta pesquisa, realizaram-se, como métodos de categorização amostral, o exame microbiológico do leite e o teste de imunodifusão para Artrite Encefalite Caprina (CAE).

Para a realização do exame de imunodifusão, foram colhidas amostras de sangue de todas as fêmeas em lactação, excluindo-se aquelas que estavam em fase final ou em período colostrar. As amostras foram obtidas através da punção da veia jugular por sistema á vácuo, e o sangue colhido em tubo Vacutainer® sem EDTA. As amostras foram então centrifugadas e os soros obtidos foram armazenados em eppendorfs e mantidos sob congelamento.

As alíquotas de leite destinadas ao exame microbiológico foram colhidas juntamente com as outras alíquotas e a colheita está especificada nas diretrizes da colheita das amostras de leite.

Os animais que apresentaram resultado positivo ao exame microbiológico do leite e no teste sorológico para diagnóstico da artrite encefalite caprina foram excluídos da pesquisa.

As 51 fêmeas utilizadas neste trabalho eram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia e certificou-se que nenhuma delas tinha recebido tratamento para mamite nos 20 dias antes da colheita.

Os animais eram alimentados com diferentes forragens (feno, capim), fornecidas *ad libitum*, sal mineral e ração comercial para cabras em lactação, fornecida aos animais no momento da ordenha.

3.2 SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS E CATEGORIZAÇÃO DAS FASES DE LACTAÇÃO

Os animais foram selecionados em linha de ordenha através do exame físico, segundo os procedimentos descritos por Grunert (1993), excluindo os animais que apresentaram qualquer alteração orgânica. Todas as metades das cabras incluídas nesta pesquisa foram avaliadas por inspeção e palpação, examinando-se o parênquima, tetos e estruturas internas (*ductus papilaris*, *sinus lactifer* e *papilaris*). Foram registrados os dados referentes às fases de lactação, eliminando-se os animais em fase colostrar, através das características macroscópicas do leite e período pós-parto mínimo de quinze dias. Os animais em período seco também foram excluídos deste trabalho, assim como os com mais de oito meses de lactação, sendo este, o período máximo de lactação em cabras da raça Saanen (PRATA et al., 1998).

As fases de lactação foram categorizadas em inicial (até 3 meses), média (lactação a partir do terceiro ao sexto mês) e final (lactação a partir do sexto ao oitavo mês).

3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Antes da ordenha dos animais foram colhidas amostras de sangue, através de punção da veia jugular, por sistema a vácuo, em tubo siliconizado com EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/ml de sangue (capacidade para 5 ml de sangue) e agulha (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer®. As amostras de sangue foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e levadas ao laboratório para posterior realização do leucograma.

Ainda na propriedade, foram confeccionados os esfregaços sanguíneos, obtidos através da extensão de uma pequena gota de sangue em uma lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada. Os esfregaços provenientes de cada amostra de sangue foram realizados em duplicata e secos com secador elétrico e guardados em laminário de madeira, para posterior realização da contagem dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue.

3.4 REALIZAÇÃO DA PROVA DO CMT

Após o exame clínico do animal e colheita das amostras de sangue, os animais foram encaminhados à sala de ordenha, realizando-se a limpeza do úbere e tetos com solução clorada e posterior secagem com papel toalha. Na seqüência foi realizada a prova do CMT, segundo os procedimentos descritos por Schalm e Noorlander (1957). Assim, o reagente específico (Reagente CMT, Fatec®) foi adicionado a 2ml de leite em placa apropriada. Após homogeneização, foi analisada a intensidade da viscosidade da mistura. Para a interpretação dos resultados, foi aplicado o mesmo critério adotado por Schalm, Carrol e Jain (1971).

Escore CMT	Descrição da reação
0 (negativa)	A mistura permanece fluida
(+) (traços)	Forma-se ligeiro precipitado que desaparece com a movimentação
+ (fracamente positiva)	Há um aumento de viscosidade sem formação de gelatina, raramente desaparece com a movimentação
++ (positiva)	A mistura imediatamente torna-se viscosa, durante a movimentação a mistura dirige-se em sentido centrífugo, deixando o centro do receptáculo descoberto. Sugere-se ocorrência de gelificação
+++ (fortemente positiva)	Ocorre gelificação imediata e evidente; durante a movimentação a mistura dirige-se em sentido centrípido, acumulando-se no centro do receptáculo, com convexidade; a massa adere ao fundo da placa

Quadro 2 - Interpretação da prova *California Mastitis Test* (CMT), segundo Schalm, Carrol e Jain (1971)

3.5 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LEITE

Antes do início da ordenha foram colhidas, das metades mamárias, amostras de leite, divididas em quatro alíquotas. A primeira alíquota de 2mL colhida, destinada ao exame microbiológico, foi precedida de cuidados de anti-sepsia e, para tanto, realizou-se a desinfecção do teto, friccionando-se, várias vezes, algodão embebido em solução de álcool 70%, principalmente sobre o orifício do teto. A amostra de leite foi colhida em frasco estéril, com angulação de 90⁰ graus em relação ao teto, para evitar a entrada de qualquer sujidade que possa contaminar a amostra; o frasco permaneceu aberto por no máximo 5 segundos, de acordo com o *National Mastitis Council* (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981) e, posteriormente, foram transportados sob refrigeração ao laboratório.

A segunda alíquota de leite foi colhida em frasco plástico com capacidade de 40 mL, contendo duas pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2nitropropane-1,3-diol), para a realização da contagem eletrônica de células somáticas. Os frascos foram homogeneizados até que o leite adquirisse uma coloração rosada, assegurando a perfeita mistura do leite com o conservante e acondicionados em caixas de papelão próprias e encaminhados ao Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Produção Animal do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz.

Para a realização da contagem microscópica direta, pela técnica de Prescott e Breed (1910), foi colhida uma terceira alíquota, em frascos de vidro com capacidade de 3 mL e transportados sob refrigeração ao laboratório.

A quarta alíquota foi colhida em frasco de polipropileno tipo *Falcon*, estéril, com capacidade para 50 mL, já contendo 45 mL de PBS (solução salina tamponada) gelada e transportada sob refrigeração ao laboratório (Anexo A).

3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras de leite colhidas foram analisadas, realizando-se a contagem de células somáticas através do método automático, determinado por citometria de fluxo e o método microscópico direto, determinado pela coloração de verde de metil e pironina-Y. Determinou-se também a contagem diferencial dos leucócitos presentes no leite de cabras sadias, através do método de citocentrifugação e o exame microbiológico do leite.

Com as amostras de sangue foram realizadas a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no sangue de cabras sadias, além do exame de imunodifusão para Artrite Encefalite Caprina, realizado com o soro dos animais previamente colhido e congelado.

3.6.1 Contagem Celular Automática

As amostras de leite, antes do início das análises, foram mantidas em banho-maria a 38°C, durante 15 minutos e a seguir, homogeneizadas, manualmente, sendo a contagem de células somáticas realizadas por citometria de fluxo utilizando-se o equipamento *Somacount* 300 da empresa Bentley Instruments Inc. Nesse procedimento uma alíquota de 3cc de leite, depois de aspirada pelo equipamento, foi misturada com brometo de etídio que cora o DNA do núcleo das células, que quando expostas a uma fonte luminosa de laser fluorescem, sendo convertidas no tubo multiplicador do equipamento em impulsos elétricos, sendo o resultado registrado em número de células somáticas/mL de leite.

3.6.2 Contagem Celular por Microscopia Direta

Na contagem microscópica direta, 10 μL de leite foi distribuído em uma área de um cm^2 , em lâmina de microscopia, previamente limpa e desengordurada. A seguir, as lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas apoiada em superfície plana e protegida (PRESCOTT; BREED, 1910). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em solução de *Carnoy's* (Anexo B) por 10 minutos. Depois de fixadas, as lâminas foram hidratadas por um minuto, em álcool etílico a 50% e em álcool etílico a 30%, respectivamente. Após, as lâminas foram coradas por 6 minutos em solução fresca preparada com pironina-Y a 0,5% e verde de metil a 0,3% em

água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas por um minuto em álcool n-butílico e água destilada, respectivamente (ZENG, 1999).

Para avaliação do número de células, foram contados 100 campos, em duplicata, utilizando-se microscópio óptico comum com objetiva de imersão. O resultado das contagens de cada amostra foi obtido calculando-se a média das contagens em duplicata e multiplicado pelo fator do microscópio, obtendo-se o valor do número de células/mL de leite.

3.6.3 Contagem diferencial de leucócitos no leite

As amostras destinadas à contagem diferencial foram centrifugadas á 450 G (2000 rpm) por 20 minutos em refrigeração de 4°C. O leite foi diluído, colocando-se 45 mL de solução salina tamponada (PBS) para cada 5 mL de leite, em tubo Falcon. O sobrenadante mais viscoso formado no espelho da amostra, constituído principalmente de gordura, foi retirado com uma espátula, antes de reverter o conteúdo do mesmo. Após, desprezou-se o restante do sobrenadante invertendo-se o frasco uma única vez. Mantendo-se o frasco invertido, os lados do frasco foram limpos com papel macio e absorvente. Apenas o botão de células formado no fundo do frasco foi preservado. Subseqüentemente, o botão de células foi desprendido do frasco pela aspensão, em fracos jatos de PBS, para, a seguir, homogeneizar o conteúdo, completando com PBS refrigerada (refazendo o volume de 50 mL). A suspensão foi novamente centrifugada (nas condições já mencionadas), sendo que o sobrenadante foi novamente desprezado, e o botão formado no fundo do frasco foi desprendido e ressuspendido em 1mL PBS refrigerada. A mesma operação foi

realizada mais uma vez e após a terceira e última ressuspensão em 1 mL de PBS, uma alíquota de 100 µl de cada suspensão celular de todas as amostras de leite foram submetidas a citocentrifugação em centrífuga da marca INCIBRÁS®, modelo CITOSPIN a uma força centrífuga relativa (FCR) de 28 g (450 rpm) durante 6 minutos. As lâminas foram confeccionadas em duplicata e secas em temperatura ambiente por 24 horas, fixadas em álcool metílico e coradas posteriormente pelo método de Rosenfeld (1947) (Anexo C). Para a coloração das lâminas com Rosenfeld, utilizou-se 1 mL de corante em cada lâmina, permanecendo 2 minutos sobre as mesmas. Decorrido este tempo adicionou-se 2 mL de água destilada e a solução foi homogeneizada, permanecendo sobre as lâminas mais 13 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas com água destilada fervida e secas naturalmente. As lâminas foram analisadas segundo a qualidade e tipos celulares predominantes, realizando-se assim a contagem diferencial dos neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, sendo os resultados obtidos expressos em porcentagem dos diferentes tipos celulares.

3.6.4 Exame Microbiológico do leite

As amostras de leite foram semeadas em placa Petri contendo ágar sangue de ovino á 5% e incubadas a 37°C durante 72 horas. O exame bacterioscópico foi realizado pelo método de gram, sendo os microrganismos classificados de acordo com *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (KRIEG; HOLT, 1984). As técnicas bacteriológicas foram empregadas conforme descrito por Lenette et al. (1985) e

Cowan (1985). Ressalta-se que todas as amostras de leite que apresentaram resultado positivo ao exame microbiológico foram excluídas da pesquisa.

3.6.5 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue

Após a homogeneização de cada amostra de sangue com EDTA, foi feita a diluição a 1:20, em pipeta hematimétrica, com líquido de Thoma e a contagem feita em câmara hematimétrica de Neubauer modificada, conforme descrito por Birgel (1982) e o resultado apresentado em milhares de células por mm^3 .

Os esfregaços sanguíneos que foram confeccionados logo após a coleta das amostras de sangue, foram submetidos á ação do corante de Rosenfeld (1947). Em cada esfregaço foram contados 100 leucócitos, identificando-se os polimorfonucleares granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os mononucleares agranulócitos (linfócitos e monócitos).

3.6.6 Teste de imunodifusão em ágar gel para detecção de anticorpos anti-vírus da artrite encefalite caprina – IDGA/CAE

A detecção de anticorpos séricos precipitantes contra o vírus da artrite encefalite caprina foi realizada pelo teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA), segundo Crawford e Adams (1981).

Foi utilizado um Kit comercial contendo 150 mL de gel de agarose a 1%, 1,0 mL de antígeno e 2,0 mL de soro padrão positivo. O frasco contendo o gel de agarose foi aquecido em banho-maria até tornar-se transparente e 16 mL foram distribuídos em placa de Petri. Após a solidificação do gel, a placa foi mantida em temperatura de 4 a 8° C por 30 minutos e posteriormente, realizou-se a perfuração do gel utilizando-se uma roseta de metal. Cada placa de Petri continha então 7 rosetas com 7 orifícios em cada roseta. O gel perfurado foi então aspirado, formando na placa orifícios com capacidade de 25µl.

As amostras armazenadas em eppendorf foram descongeladas e foram distribuídos, em poços alternados, 20µl dos soros a serem testados; nos demais poços adicionou-se 25µl de soros controles positivos para a artrite encefalite caprina, e no receptáculo central, o antígeno. Então, o sistema foi incubado a 37°C em câmara úmida, sendo a primeira leitura realizada após 48 horas de incubação, e a segunda após 72 horas.

Como reagente positivo considerou-se o soro que determinou nítida formação de linhas de precipitação, de coloração esbranquiçada, correspondente às zonas de contato antígeno-anticorpo, idêntico às linhas formadas entre o soro controle e o

antígeno. Essas linhas de precipitação foram evidenciadas pela contraposição de luz artificial, na porção inferior das placas em câmara escura.

As amostras que apresentaram resultado positivo ao exame de imunodifusão foram eliminadas da pesquisa.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interpretação dos resultados foi realizada utilizando-se os métodos estatísticos preconizados pelo *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2001).

A contagem de células somáticas apresentou distribuição não paramétrica, sendo analisada pelo teste de Kruskal-Wallis.

As porcentagens referentes aos valores de leucócitos apresentaram distribuição paramétrica, sendo analisadas pelo teste de Tukey.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre duas variáveis e sua significância foi calculada utilizando-se o software estatístico SAS (2001).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de leite e sangue, perfazendo um total de 102 amostras, provenientes de 51 cabras sadias criadas no estado de São Paulo.

5.1 CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT)

Os resultados apresentados demonstraram que houve um maior número de amostras com escore negativo ao CMT e um menor número de amostras com escore 3+, encontrando-se os valores de 74,50%, 8,82%, 8,82%, 6,86% e 0,98% para os escores negativo, traços, 1+, 2+ e 3+, respectivamente. Não houveram diferenças entre os escores traços, 1+ e 2+ (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Número de amostras e respectivas porcentagens de acordo com os escores da prova do Califórnia Mastitis Test (CMT) no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

Escores do CMT	Número de amostras	(%)
Negativo	76	74,509 ^a
Traços	9	8,823 ^b
+	9	8,823 ^b
++	7	6,862 ^b
+++	1	0,980 ^c

Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si ($p < 0.001$)

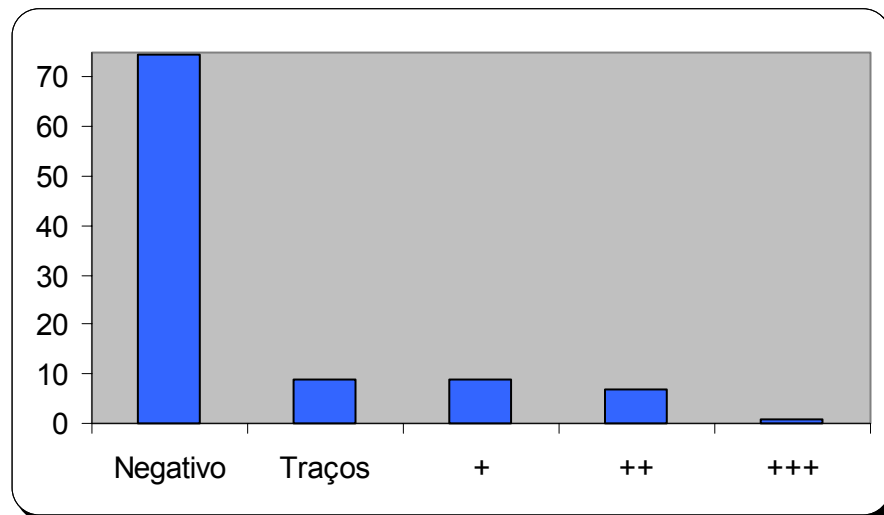


Figura 1 - Porcentagens de amostras de acordo com os escores da prova do Califórnia Mastitis Test (CMT) no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) SEGUNDO OS ESCORES DO CMT

Os valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras, quantificadas através de contador automático e microscopia direta sofreram variação significativa de acordo com os diferentes escores do CMT.

Na contagem automática, o menor valor mediano foi obtido no escore negativo do CMT (181.000 células/mL) e o valor máximo foi observado no escore 3+ (5.542.000 células/mL), ou seja, observou-se aumento de celularidade com o aumento da positividade ao CMT. Não houve diferença estatística entre os escores traços e 1+ (Tabela 2 e Figura 2).

Os valores medianos obtidos através da contagem microscópica direta tiveram aumento gradativo, com exceção da variação observada no escore 1+, atingindo o menor valor. Não houve diferença estatística entre os escores negativo e 1+ (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2 - Valores medianos das contagens de células somáticas, realizadas através de contador automático e microscopia direta, de acordo com os diferentes escores do CMT, no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

Escores do CMT	Nº Amostras	CCS Automática Células/mL	CCS Microscopia direta Células/mL	Significância
Negativo	76	181.000 ^{Ad}	74.991 ^{Bd}	p<0,00001
Traços	9	578.000 ^{Ac}	271.396 ^{Bc}	p<0,017
1+	9	628.000 ^{Ac}	71.420 ^{Bd}	p<0,04
2+	6	1.421.500 ^{Ab}	640.995 ^{Bb}	p<0,04
3+	1	5.542.000 ^{Aa}	5.049.394 ^{Aa}	p>0,7
Significância		p<0,01	p<0,02	

Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.
Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si.

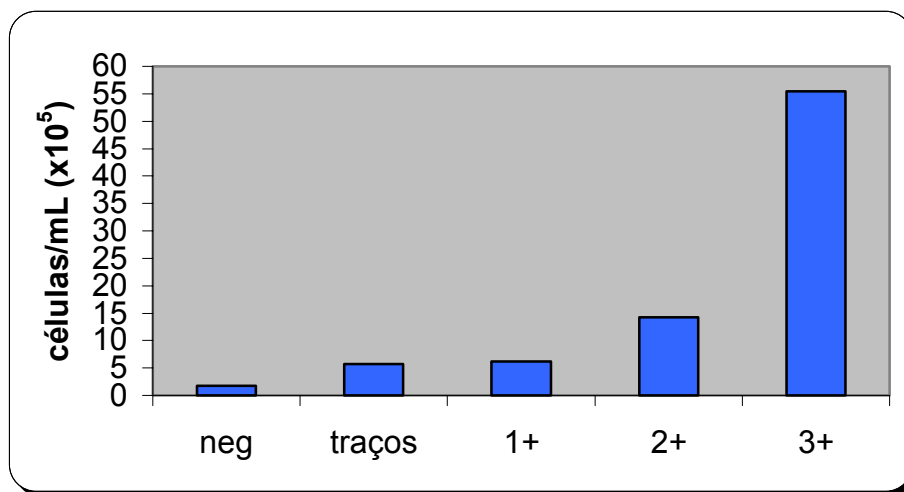


Figura 2 - Mediana da contagem automática de células somáticas (x10⁵ células/mL) conforme as reações do CMT no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

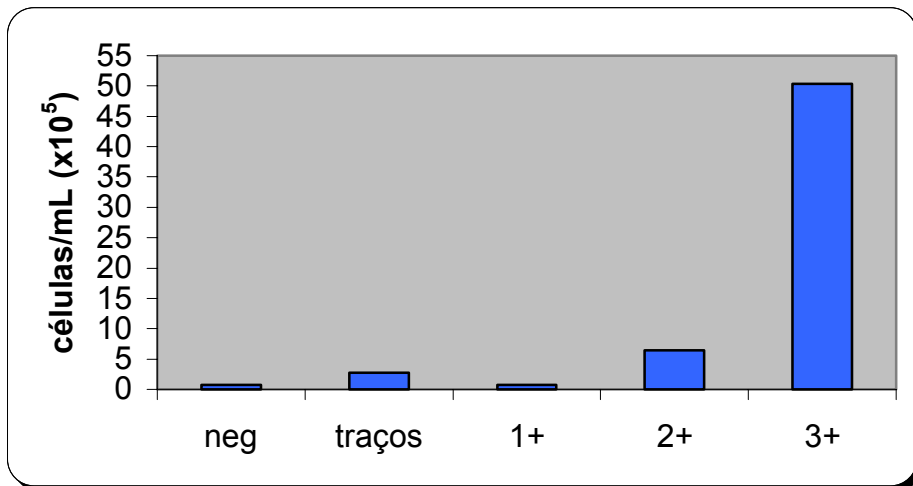


Figura 3 - Mediana da contagem microscópica direta de células somáticas ($\times 10^5$ células/mL) conforme as reações do CMT no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS SEGUNDO AS FASES DA LACTAÇÃO

Os valores medianos obtidos na contagem celular automática foram de 159.500; 508.000 e 277.500 células/mL de leite nas fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente, obtendo-se maior valor na fase intermediária quando comparada à fase inicial e final da lactação, apresentando diferença estatística da fase inicial com a fase intermediária e final (Tabela 3 e Figura 4). O valor mediano obtido durante toda a lactação foi de 406.000 células/mL de leite.

Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas, determinada através de microscopia direta pela coloração de verde de metil e pironina-Y, não apresentaram diferenças entre as fases da lactação, embora o valor tenha sido crescente com o avançar da lactação, obtendo-se os valores de 62.493; 89.275 e 146.411 células/mL, respectivamente, nas fases inicial, intermediária e final

da lactação (Tabela 3 e Figura 5). O valor mediano obtido durante toda a lactação foi de 142.840 células/mL de leite.

Tabela 3 - Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras sadias, realizadas através de contador automático e microscopia direta, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005

Fases da lactação	CCS automática Células/mL	CCS microscopia direta Células/mL	Significância
Inicial	159.500 ^{Ab}	62.493 ^{Ba}	p<0.004
Intermediária	508.000 ^{Aa}	89.275 ^{Ba}	p<0.0003
Final	277.500 ^{Aa}	146.411 ^{Ba}	p<0.02
Significância	p>0,01	p>0,13	

Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si.
Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

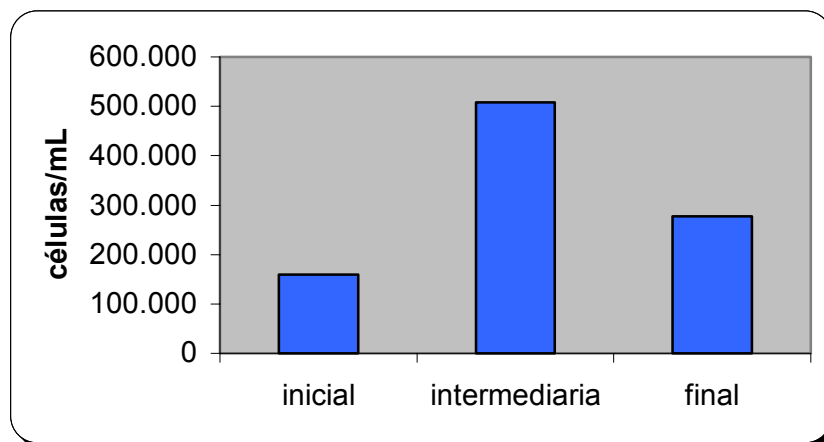


Figura 4 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS), realizada através de contador automático, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005

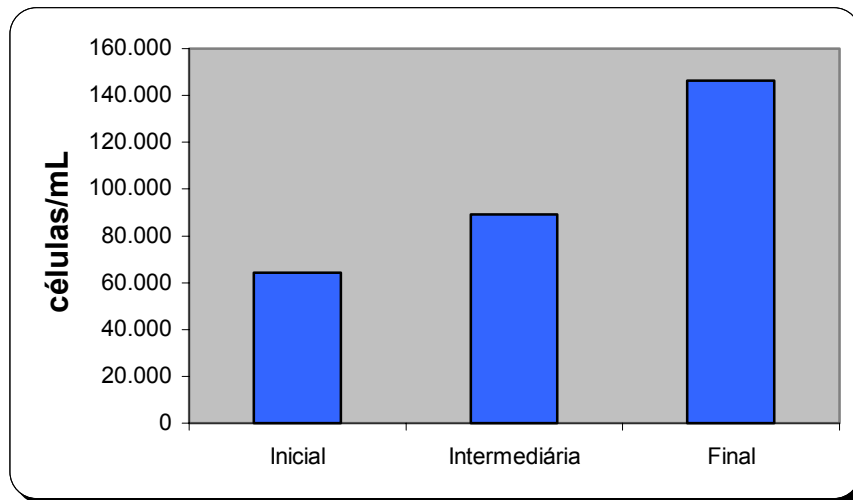


Figura 5 - Valores medianos da contagem de células somáticas (CCS) realizada através de contagem microscópica direta, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS ATRAVÉS DE CONTADOR AUTOMÁTICO E CONTAGEM MICROSCÓPICA DIRETA (COLORAÇÃO DE VERDE DE METIL E PIRONINA-Y)

Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas pelo método automático e pela microscopia direta foram de 406.000 e 142.840, respectivamente, existindo diferença estatística significativa entre estes valores ($p < 0.0001$) (Tabela 4 e Figura 6).

Os valores medianos totais obtidos através das contagens celulares por método automático e microscopia direta obtiveram correlação positiva ($r = 88\%$ e $p < 0.0001$) (Figura 7).

A técnica de contagem celular por microscopia direta, através da coloração de verde e metil e pironina-Y foi ilustrada na Figura 8, correspondendo às células somáticas presentes no leite de cabras sadias. Utilizou-se microscopia óptica de imersão para a visualização celular (1000x).

Tabela 4 - Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras sadias, realizadas através de contador automático e microscopia direta – São Paulo – 2005

Método de contagem celular	Nº Amostras	Contagem de células somáticas Células/mL
Contador automático	102	406.000 ^a
Microscopia direta	101	142.840 ^b
Significância		p<0,0001

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

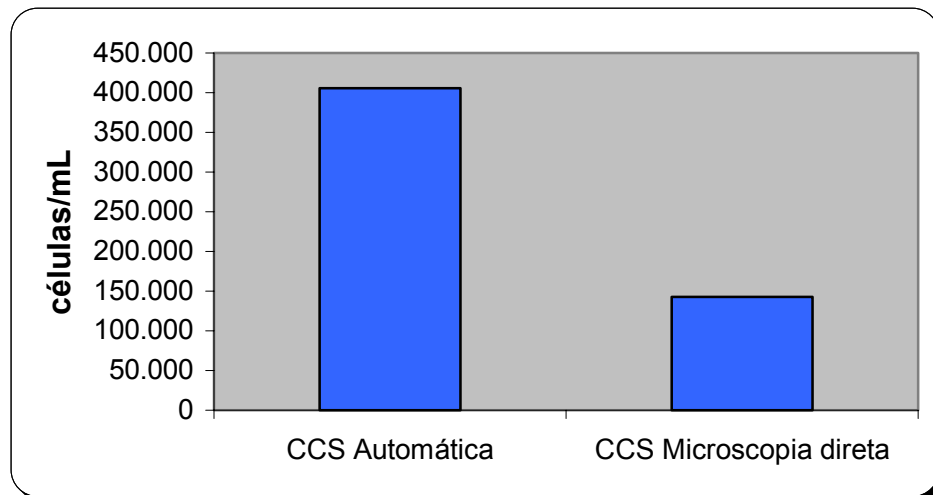


Figura 6 - Valores medianos das contagens de células somáticas realizadas através de contador automático e microscopia direta – São Paulo – 2005

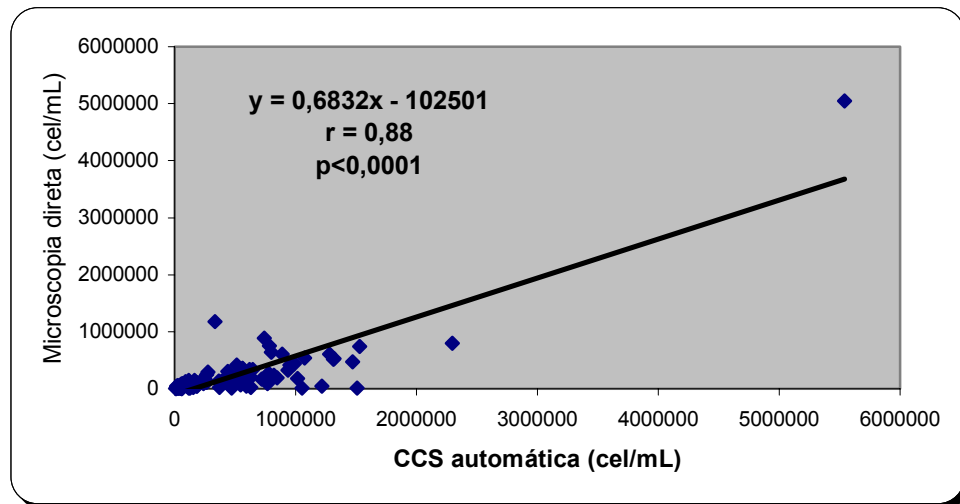


Figura 7 – Correlação entre a CCS automática e microscópica direta – São Paulo – 2005

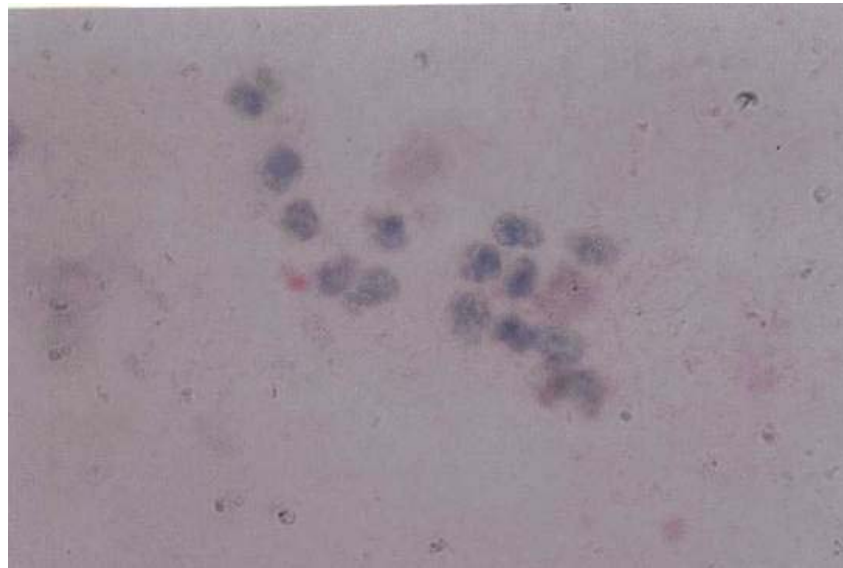


Figura 8 – Fotomicrografia de células somáticas coradas com verde de metil e pironina-Y presentes no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

5.5 RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E AS METADES MAMÁRIAS

Analisando-se a quantidade de células somáticas presentes na glândula mamária das cabras estudadas, obtiveram-se os valores medianos de 380.500 e 434.000, nas glândulas direita e esquerda, respectivamente, através da contagem celular eletrônica e 148.197 e 132.127, nas glândulas direita e esquerda, respectivamente, através da contagem microscópica direta. Não observou-se diferença estatística entre a contagem celular nas glândulas direita e esquerda (Tabela 5 e Figura 9).

Tabela 5 - Valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite, realizadas através de contador automático e microscopia direta, nas glândulas mamárias direita e esquerda de cabras sadias - São Paulo – 2005

	CCS Automática Células/mL	CCS microscopia direta Células/mL	Significância
Glândula direita	380.500 ^{Aa}	148.197 ^{Ba}	P<0,0015
Glândula esquerda	434.000 ^{Aa}	132.127 ^{Ba}	P<0,004
Significância	p>0,8	p>0,6	

Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si
Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

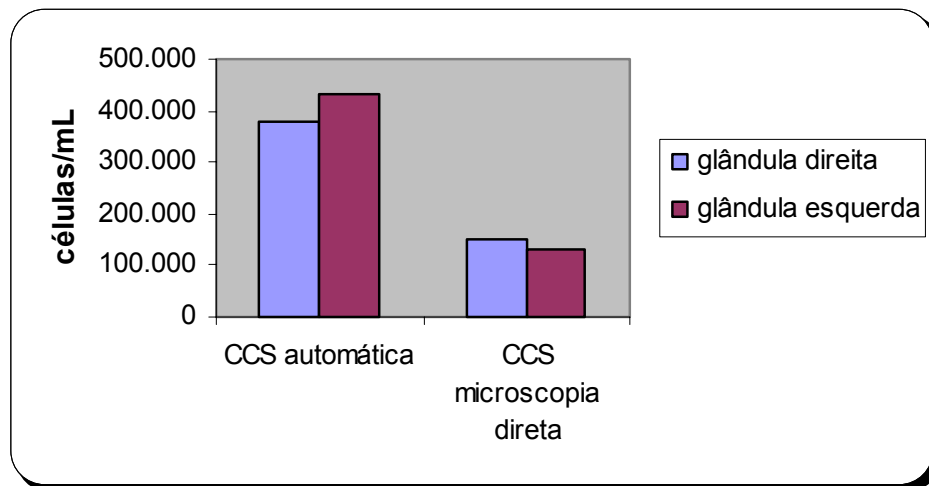


Figura 9 - Valores medianos das contagens de células somáticas nas glândulas direita e esquerda de cabras sadias – São Paulo - 2005

5.6 LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE

Os diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite de cabras sadias foram determinados através da citocentrifugação e os valores expressos em porcentagens. O valor médio total encontrado foi de $73,24 \pm 18,35\%$ de neutrófilos, $3,55 \pm 3,06\%$ de linfócitos e $24,33 \pm 18,89\%$ de monócitos. O leucócito mais encontrado no leite foi o neutrófilo.

Analisando-se os leucócitos presentes em cada glândula mamária caprina, obtiveram-se os valores médios de $73,00 \pm 29,24\%$; $24,57 \pm 19,94\%$ e $2,49 \pm 3,05\%$ de neutrófilos, monócitos e linfócitos, respectivamente, nas amostras de leite obtidas da glândula mamária direita (Tabela 6 e Figura 10). Na glândula mamária esquerda, obtiveram-se os valores de $72,74 \pm 18,84\%$; $23,83 \pm 17,01\%$ e $2,32 \pm 3,02\%$ de segmentados, monócitos e linfócitos, respectivamente (Tabela 6 e Figura 11). Não

houveram diferenças entre os valores relativos obtidos na contagem diferencial de leucócitos do leite das glândulas mamárias direita e esquerda (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores relativos (médias e desvios-padrão) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite de cabras sadias, obtidos através da citocentrifugação, nas glândulas mamárias direita e esquerda – São Paulo – 2005

Citocentrifugação	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
Glândula Direita	73,00 ± 29,24 ^a	2,49 ± 3,05 ^a	24,57 ± 19,94 ^a
Glândula Esquerda	72,74 ± 18,84 ^a	2,32 ± 3,02 ^a	23,83 ± 17,01 ^a
Significância	>0,9	>0,8	>0,8

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

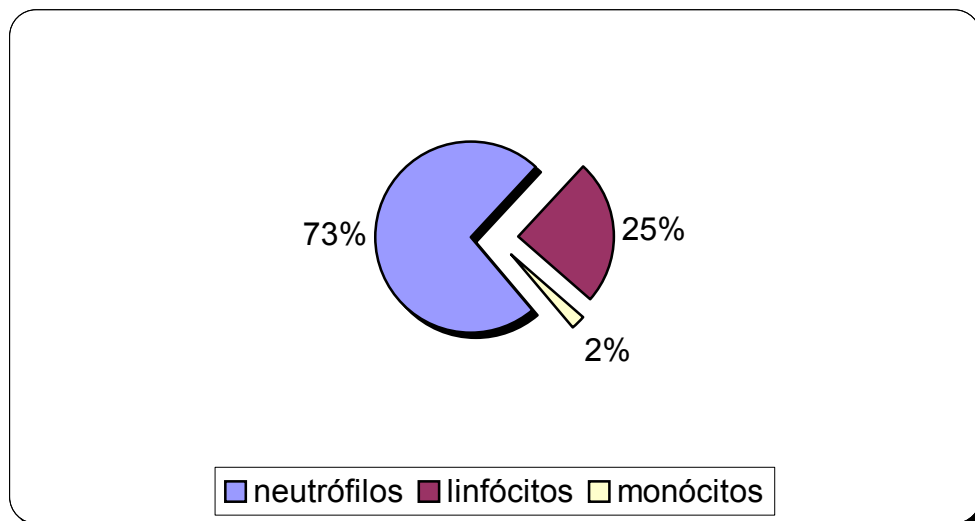


Figura 10 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos presentes na glândula mamária direita de cabras sadias – São Paulo - 2005

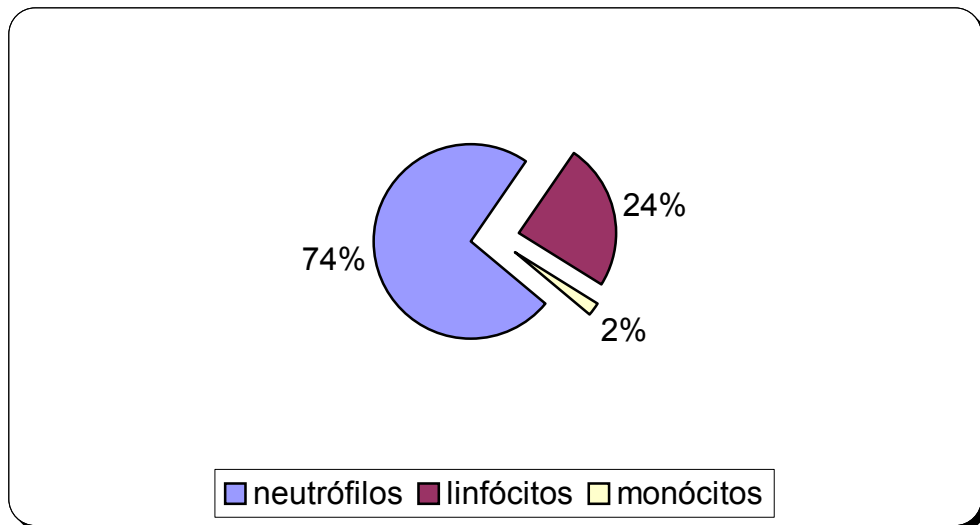


Figura 11 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos presentes na glândula mamária esquerda de cabras sadias – São Paulo – 2005

Os leucócitos foram analisados ainda de acordo com as fases da lactação, obtendo-se os valores médios e desvios-padrão para cada tipo de leucócito. Os valores médios, nas fases inicial, intermediária e final da lactação, foram de respectivamente, $77,0 \pm 30,5\%$, $76,5 \pm 20,9\%$ e $65,3 \pm 25,6\%$ de neutrófilos; $2,24 \pm 3,26\%$, $2,04 \pm 2,33\%$ e $2,14 \pm 2,81\%$ de linfócitos e $22,6 \pm 20,2\%$, $21,4 \pm 20,0\%$ e $23,0 \pm 20,0\%$ de monócitos. Não houveram diferenças estatísticas entre as fases da lactação (Tabela 7 e Figura 12).

A técnica da citocentrifugação, para a determinação da contagem diferencial de leucócitos no leite de cabras sadias foi ilustrada, apresentando um neutrófilo e um macrófago, respectivamente, empregando-se microscopia óptica de imersão (1000x) (Figura 13).

Tabela 7 – Valores relativos (médias e desvios-padrão) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite de cabras sadias, nas diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005

Fase da lactação	Nº Amostras	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
Inicial	57	77,0 ± 30,5 ^a	2,24 ± 3,26 ^a	22,6 ± 20,2 ^a
Intermediária	23	76,5 ± 20,9 ^a	2,04 ± 2,33 ^a	21,4 ± 20,0 ^a
Final	20	65,3 ± 25,6 ^a	2,14 ± 2,81 ^a	23,0 ± 16,2 ^a
Significância		p> 0,1	p> 0,96	p> 0,95

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

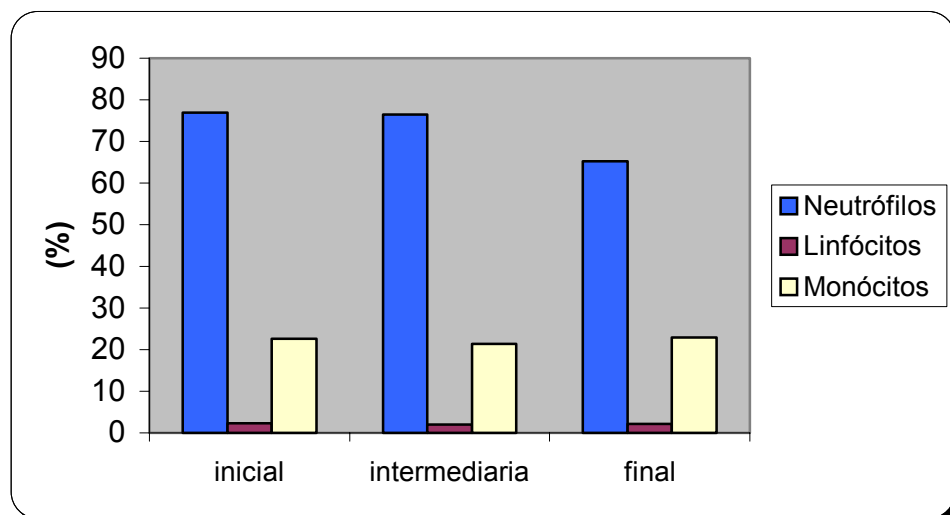


Figura 12 – Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos presentes no leite de cabras sadias, nas diferentes fases da lactação – São Paulo - 2005

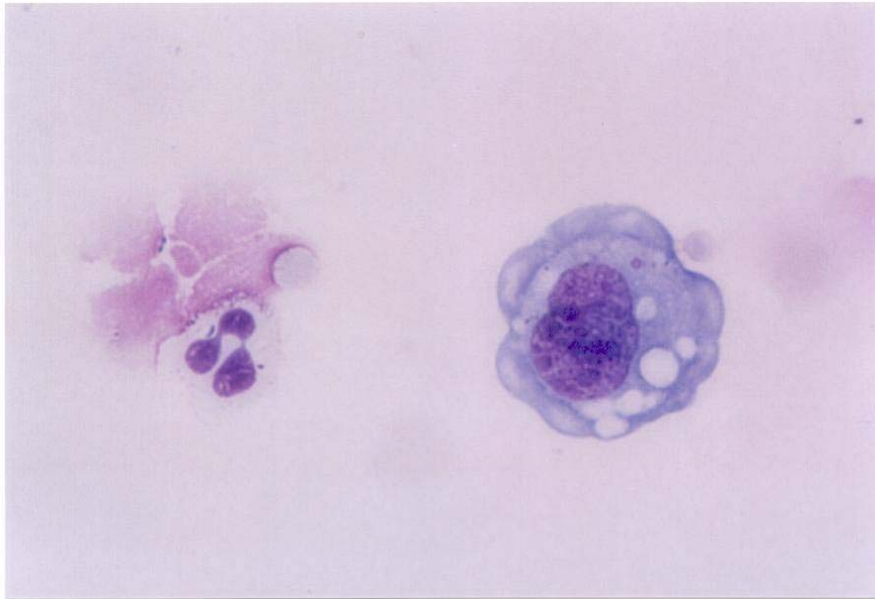


Figura 13 – Fotomicrografia de um neutrófilo (esquerda) e um macrófago (direita) obtidos através da citocentrifugação, presentes no leite de cabras sadias – São Paulo - 2005

5.7 LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE

A porcentagem dos diferentes tipos de leucócitos presentes no sangue foi determinada, obtendo-se as médias e desvios-padrão de $56,8 \pm 11,8\%$; $38,5 \pm 11,8\%$; $2,8 \pm 1,7\%$ e $1,9 \pm 1,6\%$ de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, respectivamente (Tabela 8 e Figura 14). Os leucócitos apresentaram diferença estatística entre eles ($p < 0,003$).

O leucócito encontrado em maior quantidade no sangue das cabras foi o neutrófilo.

Tabela 8 - Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos presentes no sangue de cabras sadias – São Paulo – 2005

Leucócitos	Média e desvio-padrão (%)
Neutrófilo	56,8 ± 11,8 ^a
Linfócito	38,5 ± 11,8 ^b
Monócito	2,8 ± 1,7 ^c
Eosinófilo	1,9 ± 1,6 ^d
Significância	p < 0,003

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

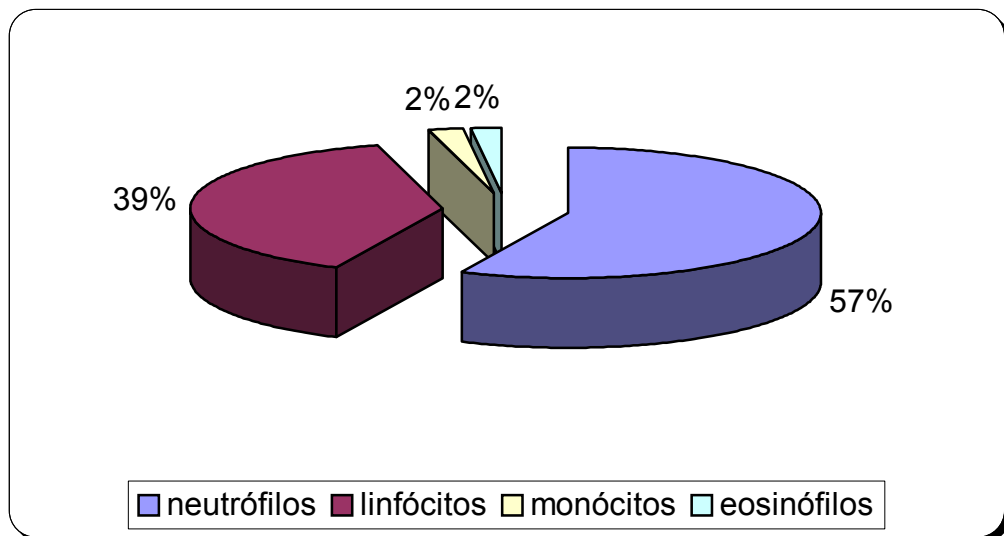


Figura 14 - Valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias – São Paulo – 2005

5.8 RELAÇÃO ENTRE OS LEUCÓCITOS DO LEITE E LEUCÓCITOS DO SANGUE

Os valores de correlação entre os diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite e no sangue foram de $r=-0,012$ e $p>0,9$; $r=-0,20$ e $p>0,06$; $r=0,113$ e $p>0,28$ para neutrófilos, linfócitos e monócitos, respectivamente.

Analisando-se a contagem de leucócitos totais encontrados no sangue nas fases inicial, intermediária e final da lactação, foram encontrados os valores médios de $8458,0 \pm 3227,2$; $8471,4 \pm 3838,0$ e $8511,9 \pm 2482,4$ células/mL de sangue, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as fases da lactação (Tabela 9 e Figura 15).

As médias e os desvios-padrão dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue, de acordo com as fases da lactação foram de $55,8 \pm 11,8\%$; $39,1 \pm 11,8\%$; $2,77 \pm 1,9\%$ e $2,10 \pm 2,9\%$ de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, respectivamente, na fase inicial da lactação. Na fase intermediária, os valores obtidos foram de $51,7 \pm 11,8\%$; $44,1 \pm 11,8\%$; $2,83 \pm 1,37\%$ e $1,29 \pm 1,0\%$ para neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, respectivamente. Na fase final da lactação foram encontrados os valores de $65,1 \pm 8,11\%$; $30,1 \pm 8,6\%$; $2,71 \pm 1,5\%$ e $2,00 \pm 1,89\%$, para neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, respectivamente. Foi observado um predomínio de neutrófilos na fase final da lactação, apresentando diferença estatística quando comparada às fases inicial e intermediária ($p<0,0001$). Na fase final da lactação observou-se também o menor valor de linfócitos, que apresentou diferenças estatísticas quando comparada às fases inicial e intermediária ($p<0,0001$). Os valores médios de monócitos e eosinófilos presentes no sangue não

apresentaram diferenças estatísticas entre as fases da lactação (Tabela 10 e Figura 16).

Tabela 9 - Valores absolutos dos leucócitos totais encontrados no sangue de cabras sadias, nas diferentes fases de lactação – São Paulo – 2005

Fase da lactação	Leucócitos totais Céls/mL
Inicial	8458,0 ± 3227,2 ^a
Intermediária	8471,4 ± 3838,0 ^a
Final	8511,9 ± 2482,4 ^a
Significância	p> 0,9

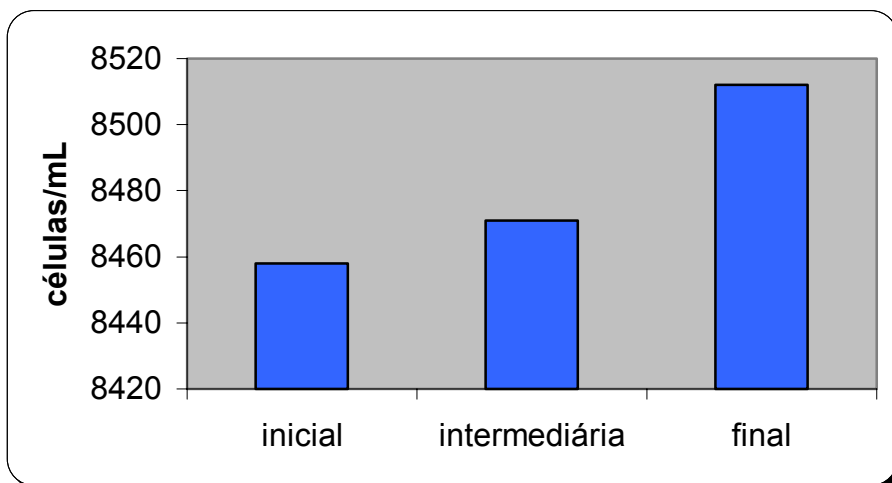


Figura 15 – Valores absolutos de leucócitos totais no sangue de cabras sadias de acordo com as diferentes fases da lactação – São Paulo – 2005

Tabela 10 – Médias e desvios-padrão dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias de acordo com as fases da lactação – São Paulo – 2005

Fases da lactação	Nº Amostras	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Eosinófilos (%)
Inicial	53	55,8 ± 11,8 ^b	39,1 ± 11,1 ^a	2,77 ± 1,9 ^a	2,10 ± 2,9 ^a
Intermediária	23	51,7 ± 11,8 ^b	44,1 ± 11,8 ^a	2,83 ± 1,37 ^a	1,29 ± 1,0 ^a
Final	20	65,1 ± 8,11 ^a	30,1 ± 8,6 ^b	2,71 ± 1,5 ^a	2,00 ± 1,89 ^a
Significância		p < 0,0001	p < 0,001	p > 0,9	p > 0,4

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

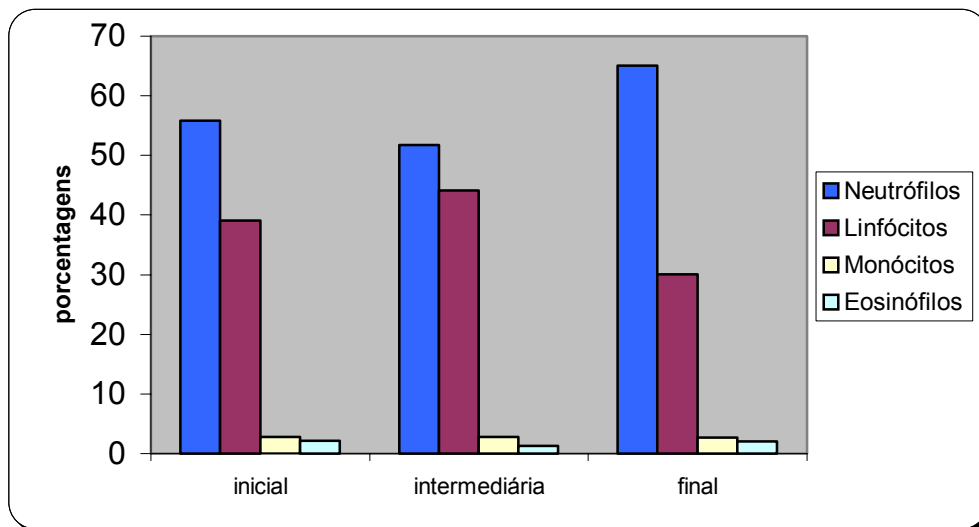


Figura 16 – Valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue de cabras sadias, de acordo com as diferentes fases da lactação – São Paulo - 2005

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 CALIFÓRNIA MASTITIS TEST

Os valores medianos das contagens celulares obtidas através de contador automático foram de 181.000, 578.000, 628.000, 1.421.500 e 5.542.000 células/mL de leite, correspondendo, respectivamente, aos escores negativo, traços, 1+, 2+ e 3+ do CMT, observando-se que, a celularidade aumenta conforme aumenta a intensidade da reação ao CMT, fato este já citado por outros autores (CONTRERAS et al., 1996; ROTA et al., 1994; SCHALM; CARROL, JAIN, 1971; SILVA et al., 2001).

Os valores encontrados foram semelhantes aos observados por Contreras et al. (1996), que determinaram os valores das células somáticas e realizaram o exame microbiológico no leite de cabras com e sem infecção mamária, sendo os valores semelhantes a este estudo somente dos animais livres de infecção.

Os valores foram inferiores aos encontrados por Silva et al. (2001), porém, os animais analisados neste estudo não estavam isentos de infecção mamária, o que poderia elevar o valor da Contagem de Células Somáticas.

Com relação à contagem celular microscópica direta, determinada pela coloração de verde de metil e pironina-Y, os valores medianos encontrados foram de 74.991, 271.396, 71.420, 640.995 e 5.046.394 células/mL, correspondendo aos escores negativo, traços, 1+, 2+ e 3+ do CMT, respectivamente. Encontrou-se um número maior na contagem celular no escore traços, quando comparado ao escore

1+ , o que pode ser explicado através da subjetividade na utilização do escore traços na classificação da celularidade do leite caprino.

Sabe-se que a prova do CMT ainda possui limitações quando se deseja avaliar a celularidade do leite caprino, tanto que muitos autores consideram o escore de 1+ como sendo o limite mínimo na avaliação da quantidade de células somáticas de cabras sadias, livres de contaminação mamária (SCHALM; CARROL; JAIN, 1971; PETERSEN, 1981; SMITH; ROGUINSKY, 1977).

Contreras et al. (1996) analisaram as células somáticas de animais infectados e não infectados, classificando-os de acordo com os escores do CMT, com os escores negativo e traços pertencendo ao mesmo grupo. No trabalho realizado por Perrin et al. (1997), os animais foram separados de acordo com os grupos negativo e 1+; 2+ e 3+, respectivamente, ou seja, o escore traços não foi usado. Nos outros escores das amostras deste trabalho observou-se um aumento do número de células, conforme o aumento do escore do CMT.

6.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

No presente estudo, o valor mediano das células somáticas, contadas em sistema eletrônico de citometria de fluxo e pela contagem microscópica direta, foi de 406.000 e 142.840 células/mL de leite, respectivamente.

Os valores obtidos na contagem microscópica direta foram semelhantes aos encontrados por Dulin, Paape e Wergin (1982), que determinaram a contagem celular através da utilização de diversos corantes. A contagem celular automática

coincidiu com as contagens encontradas por Droke, Paape e DiCarlo, (1993) e Paape et al. (2001). Alguns autores (ANDRADE et al., 2001; CONTRERAS et al., 1996; FERNANDES, 2002; PARK; HUMPHREY, 1986; SILVA, 1997), encontraram valores médios maiores que os obtidos neste estudo. Sabe-se que o número de células somáticas presentes no leite é influenciado por diversos fatores não infecciosos, tais como número de lactações, raças e do próprio ambiente de criação e tipo de ordenha realizado na propriedade, fatos que poderiam justificar as diferenças de contagens encontradas em relação aos trabalhos acima citados.

Animais jovens e com poucas lactações podem apresentar contagens celulares mais baixas e com presença de polimorfonucleares (BARBOSA et al., 2001), fato também ocorrido neste trabalho, e ainda que não fosse demonstrado, pode-se afirmar que a maioria das cabras envolvidas na pesquisa eram primíparas ou com poucas lactações.

Um número maior de lactações aumenta a probabilidade de ocorrerem infecções ou inflamações na glândula mamária, podendo manifestar, mais tardiamente, como aumento da celularidade do leite (FERNANDES, 2002). Isso pode ser observado também com o avançar da lactação e conseqüente diminuição na produção de leite.

O limite máximo de células que pode ser encontrado no leite de cabras de boa qualidade é de 1×10^6 células/mL, valor estipulado pelo Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (ZENG, 1996). Na presente investigação obteve-se teor celular mediano menor que o estabelecido pelo órgão citado.

Os valores medianos de células somáticas (células/mL) encontrados no leite foram crescentes durante a lactação quando utilizou-se a contagem microscópica direta, apresentando valores maiores na fase final, porém, sem diferença estatística.

Sabe-se que o valor da contagem de células somáticas aumenta com o avançar da lactação, fato já relatado por diversos autores (DROKE; PAAPE; DICARLO, 1993; GOMES, 2003; GONZALO, 1995). Alguns autores (DROKE; PAAPE; DICARLO, 1993; GONZALO, 1995; PARK; HUMPHREY, 1986) verificaram maiores níveis celulares nas primeiras semanas pós-parto, que diminuíram, durante o período de máxima produção de leite, voltando a aumentar até o final da lactação, resultados também observados neste trabalho.

Observou-se um pico máximo de células na fase intermediária quando se utilizou contagem eletrônica, fase esta que compreende do quarto ao sexto mês de lactação. O mesmo também foi encontrado por Gomes (2003) e Zeng (1996) utilizando a mesma metodologia de contagem celular. Este fato pode ter ocorrido devido ao aumento celular ocorrido no quarto mês de lactação, conforme observado também por alguns autores (HAENLEIN; KRAUSS, 1974), que determinaram que o aumento estrogênico sérico estivesse relacionado ao aumento da contagem celular, fato ainda não completamente esclarecido. Algum mecanismo ainda não explicado associado ao estro leva a um aumento da contagem celular, independente do volume de leite produzido nesta fase ou processo infeccioso da glândula mamária (McDOUGALL; VOERMANS, 2002).

Os resultados encontrados no presente estudo diferiram aos obtidos por Das e Singh (2000) que verificaram valores decrescentes do início até 22 semanas de lactação, porém a avaliação celular feita pelos autores citados foi realizada através de microscopia direta com azul de metileno associada ao estudo da morfologia celular, que não é recomendado para a espécie caprina, pois não exclui a mensuração dos corpúsculos citoplasmáticos.

Observou-se diferença estatística entre a contagem celular automática e a microscópica direta ($p < 0.0001$), diferente da maioria dos autores (Arcuri et al., 2004; Droke; Paape; DiCarlo, 1993; Dulin; Paape; Wergin, 1982; Zeng et al., 1999), porém, vale ressaltar que, a maioria das contagens foi realizada em contador automático calibrado com leite de vaca. Estudos realizados utilizando-se citometria de fluxo demonstraram que existem diferenças marcantes entre a densidade e a granulação das células somáticas de vacas e cabras, resultando em função e número celulares diferentes (DULIN; PAAPE; WERGIN, 1982). Além disso, valores das contagens obtidas com aparelho calibrado com leite de vaca são 27,3% maiores do que as mesmas amostras quando submetidas á contagem com aparelho calibrado com leite de cabra (ZENG, 1996).

Andrade et al. (2001) analisaram o leite de 15 cabras da raça Alpina, realizando-se microscopia direta através da coloração com azul de metileno e contagem celular automática em aparelho calibrado com leite de vaca, e obtiveram valores bem maiores aos encontrados nesta pesquisa. Zeng (1996) determinou a contagem celular em animais da mesma raça, porém, com aparelho calibrado com leite de cabra, encontrando valores inferiores aos de Andrade et al. (2001) e semelhantes aos desta pesquisa.

Arcuri et al. (2004), analisaram a contagem de células somáticas no leite de 86 cabras e utilizaram aparelho calibrado com leite de animais da mesma espécie, além da contagem microscópica direta com verde de metil e pironina-Y e não obtiveram diferenças entre os dois métodos.

Nesta pesquisa ressalta-se que a contagem microscópica direta foi realizada contando-se apenas células íntegras, com núcleo visível e íntegro, o que poderia

estar levando a uma contagem mais baixa que a dos outros estudos realizados, caso tenha sido contado também células rompidas e/ou degeneradas.

A pironina é um corante específico de DNA, podendo ser utilizado para diferenciar células que contém DNA de células que contém somente RNA ou corpúsculos citoplasmáticos (DULIN; PAAPE; WERGIN, 1982) sendo um método de determinação celular reconhecido pelo FDA. Porém, a técnica de coloração é extremamente trabalhosa e pouco utilizada nos laboratórios de rotina, podendo, desta maneira, ocorrer erros na coloração ou células que foram hipocoradas, levando a dificuldade maior no momento da contagem. Barbosa et al., 2004, utilizaram os corantes hematoxilina-eosina e broadhurst-palley para determinar a contagem de células somáticas no leite de ovelhas, e encontraram diferenças entre as duas colorações, por possível erro na técnica da coloração com hematoxilina-eosina.

Não se pode esquecer também da presença dos corpúsculos citoplasmáticos no leite de cabras, aparecendo em valores de 3 a 94% (DULIN; PAAPE; WERGIN, 1982), fato que também pode alterar a contagem em aparelho calibrado com leite de vaca, não excluindo totalmente os corpúsculos citoplasmáticos.

A correlação positiva entre as contagens celulares automática e microscópica direta foi observada, ou seja, houve aumento na celularidade relacionado ao aumento nos escores do CMT ou á fase da lactação, tanto na contagem celular eletrônica quanto na microscópica direta, fato também observado por Andrade et al. (2001), que encontraram uma correlação positiva de 76% entre a contagem microscópica direta e a automática e Pettersen (1981), que encontrou uma correlação de 82%.

Nesta pesquisa não foram observadas diferenças entre a análise qualitativa de células somáticas obtidas das metades mamárias direita e esquerda. As diferenças entre as contagens celulares de uma glândula para outra aparecem somente em casos de mamite, indicando um efeito local (Pettersen, 1981). Ressalta-se que nesta pesquisa foram utilizados somente animais livres de infecção mamária.

6.3 LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE

Os valores relativos dos tipos leucocitários presentes no leite caprino foi determinado através da citocentrifugação. Sabe-se que os esfregaços possuem vários fatores que levam à erros na determinação da contagem celular, por distribuir as células na lâmina de maneira não uniforme, com as células maiores, como os leucócitos polimorfonucleares localizando-se na periferia e linfócitos localizando-se na porção central. As células podem ainda, serem rompidas ou danificadas durante a confecção do esfregaço, levando à alterações nas técnicas de coloração (BIRGEL, 1982). A técnica da citocentrifugação promove uma distribuição homogênea das células do leite e com o mínimo de dano celular, facilitando a contagem e evitando erros de coloração (DULIN; PAAPE; WEINLAND, 1982).

Foram observados valores decrescentes nas porcentagens de neutrófilos segmentados (73,24%), monócitos (24,33%) e linfócitos (3,55%), concordando com os resultados obtidos por Barbosa et al. (2001), Dulin, Paape e Weinland (1982) e Dulin et al. (1983).

Os neutrófilos normalmente aparecem em maior quantidade no leite de cabras infectadas ou não infectadas, correspondendo a valores de 45 a 74% das células somáticas nas cabras não infectadas e de 71 a 86% em cabras infectadas (PAAPE et al., 2001). Este leucócito encontra-se também em maior quantidade no início da lactação, onde se observa uma produção maior de leite (DRAKE et al., 1992).

Os neutrófilos possuem função fagocítica, exercendo importante mecanismo de defesa a glândula mamária, independente do estado da mesma (BARBOSA et al., 2001). Mesmo mamas livres de infecção são supridas constantemente com neutrófilos (PAAPE; CAPUCO, 1996).

A presença de um maior predomínio de células polimorfonucleares no leite dos animais estudados pode ser devido também à idade e número de lactações dos mesmos. Animais jovens e com poucas lactações apresentam predomínio de células polimorfonucleares, fato observado também nesta pesquisa, o que poderia ser justificado, pois a maioria das cabras eram primíparas ou com poucas lactações.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos de Rota et al. (1993), onde houve aumento dos polimorfonucleares enquanto as outras células diminuíram. Foram utilizados animais de primeira a quarta lactação, observando um aumento de 45,8 a 70,3% nos leucócitos polimorfonucleares e uma diminuição dos valores de macrófagos de 20 a 14,4% e nos linfócitos de 12,5 a 4,7%.

Os monócitos/macrófagos compreendem 15 a 41% do total de células presentes no leite de cabras saudáveis (PAAPE et al., 2001), valores estes coincidentes aos encontrados nesta pesquisa. Sabe-se que os macrófagos são atraídos quando existe invasão de patógenos ou liberação de moléculas por células e tecidos danificados, através da ativação gerada pelos neutrófilos mortos, após a realização

da fagocitose. Ocorre então destruição dos agentes através de mecanismos oxidativos e não oxidativos (TIZARD, 2002).

Os valores de linfócitos foram inferiores ao encontrados por Paape et al. (2001) e semelhantes aos encontrados por Droke, Paape e DiCarlo (1993). Os linfócitos desempenham papel importante no leite, mais especificamente em casos de infecção por *Staphylococcus*, encontrando aumentos significantes deste leucócito nesta situação (RAINARD; RIOLLET, 2004).

Os valores relativos dos diferentes leucócitos não apresentaram diferenças entre as fases da lactação, demonstrando que, em animais sadios, os valores leucocitários permanecem estáveis durante as fases da lactação.

6.4 LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE

A média e o desvio-padrão dos leucócitos totais presentes no sangue dos animais estudados foi de 8525 ± 3244 células/mL de sangue, valores coincidentes aos encontrados na literatura (BENESI, 1982; RASTOGI; SINGH, 1990) e menores que Das e Singh, (1999), que utilizaram animais mestiços e Barbosa et al. (2001), que justificaram o valor total de leucócitos ter sido maior que o encontrado por outros autores pelo fato da colheita ter sido realizada no período da tarde.

Com relação aos valores relativos dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue, os valores encontrados neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Barbosa et al. (2001), que estudaram animais da raça Saanen, criados no nordeste do Brasil.

O neutrófilo foi o mais encontrado, já que os polimorfonucleares estão em maior quantidade no sangue de animais adultos, seguido pelo linfócito, monócito e eosinófilo (BIRGEL, 1969), predomínios estes também encontrados por Barbosa et al. (2001) e diferindo dos valores encontrados por Das e Singh, (2000), que observaram maior freqüência de linfócitos. Rastogi e Singh (1990) analisaram o hemograma de animais que viviam em regiões montanhosas e encontraram valores de segmentados e linfócitos diferentes aos obtidos neste trabalho. As contagens leucocitárias em caprinos sofrem influência da raça, tipo de alimentação e local de criação (BIRGEL, 1969).

Os valores de leucócitos totais e diferenciais encontrados neste trabalho estão de acordo com os valores observados na literatura, relatando desta maneira, quadros leucocitários de animais hípidos.

6.5 RELAÇÃO ENTRE OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE COM OS LEUCÓCITOS PRESENTES NO SANGUE

Não houve correlação entre os leucócitos do sangue e do leite, fato que pode ser explicado, pois os animais analisados eram sadios, livres de qualquer alteração orgânica ou presença de infecção na glândula mamária ou portadores do vírus da Artrite Encefalite Caprina. Segundo alguns autores, a correlação negativa entre os leucócitos do sangue e leite existe em casos de processo inflamatório da glândula mamária, onde haveria uma migração dos leucócitos presentes na corrente sanguínea para a glândula mamária, como linha primária de defesa (PAAPE;

CAPUCO, 1996; PETERSEN, 1981). Os neutrófilos levam aproximadamente 2 horas para atingirem a glândula mamária, após a invasão de um patógeno na cisterna do teto. Após ocorrer o sinal migratório, os mesmos se aderem ao endotélio capilar e migram através das células endoteliais até a matriz extracelular do parênquima mamário, atravessando posteriormente o epitélio da cisterna do teto (RAINARD; RIOLLET, 2004). Porém, o sinal migratório ocorre somente através de estímulos epiteliais determinados por bactérias. Como o presente trabalho analisou somente o leite de cabras livres de infecção mamária, era de se esperar que tal fenômeno não ocorresse.

Guidry, Paape e Pearson (1976) determinaram a contagem de leucócitos no sangue de vacas sadias em diferentes períodos, e observaram um decréscimo nos valores de neutrófilos no sangue 24 horas pós-parto, devido ao trauma no aparelho reprodutivo dos animais e a perda dos neutrófilos para o colostro, porém, estes valores voltaram rapidamente ao normal, observando-se um fluxo de células vindas do sistema hematopoiético e não do “pool” marginal, através da presença de neutrófilos imaturos na circulação sanguínea.

Quando se analisou o valor médio total de leucócitos no sangue nas fases da lactação, observou-se um aumento gradativo na contagem dos leucócitos com o avançar da lactação, porém, sem diferença estatística, fato também encontrado por Das e Singh (2000), porém, com valores mais altos de leucócitos totais. Este aumento leucocitário no sangue durante as fases da lactação é semelhante ao aumento do número de células somáticas no leite durante as fases da lactação, existindo assim, um perfeito equilíbrio na produção e destruição celular, mantendo os níveis de leucócitos no sangue e leite sempre constantes em animais sadios (Jain, 1986).

Com relação á contagem diferencial dos leucócitos no sangue durante as fases da lactação, observou-se um maior valor na quantidade de neutrófilos na fase final da lactação e uma diminuição dos linfócitos na mesma fase. Os neutrófilos e os linfócitos são os leucócitos encontrados em maior quantidade no sangue de caprinos sadios, porém, as variações entre eles, quando existentes, são opostas, ou seja, quando ocorre um aumento dos valores de neutrófilos observa-se uma diminuição nos linfócitos e vice-versa (BIRGEL, 1969). O mesmo foi observado neste trabalho, com diferenças estatísticas entre os dois leucócitos na fase final da lactação. Os linfócitos diminuem nas fases em que ocorrem aumentos nos valores de neutrófilos, fato já elucidado. O papel dos linfócitos na lactação não está completamente esclarecido, por haver diferentes tipos exercendo diferentes funções, sendo necessário a quantificação dos tipos de linfócitos para perfeita análise de suas funções (DAS; SINGH, 2000). Neste

Com relação aos valores de eosinófilos no sangue, os mesmos foram semelhantes durante a lactação. Birgel (1969) analisou o leucograma de diferentes animais da espécie caprina, comparando-os de acordo com raça, tipo de alimentação e sexo e não encontrou diferenças estatísticas entre os grupos com relação à contagem dos eosinófilos. Os valores deste tipo de leucócito são determinados por variações individuais e no presente trabalho, houveram dois animais com contagens mais altas de eosinófilos, que encontravam-se nas fases inicial e final da lactação, respectivamente, fato que pode ter contribuído para um maior valor nestas fases, porém, sem diferenças estatísticas significantes.

Os valores de monócitos no sangue foram praticamente os mesmos nas três fases da lactação, não apresentando diferenças estatísticas. Das e Singh (2000) não observaram a presença de monócitos no sangue de alguns animais analisados em

certos períodos da lactação, indicando que este leucócito provavelmente não possui significância com o estágio da lactação e a contagem celular, havendo apenas variações individuais.

Das e Singh (2000) determinaram a contagem de células somáticas, produção e composição do leite de cabras mestiças durante toda a lactação, assim como a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no sangue, e observaram um declínio na contagem total dos leucócitos, basófilos, eosinófilos e monócitos próximo ao terceiro mês de lactação, sugerindo uma migração destes leucócitos para a glândula mamária como mecanismo de defesa. Porém, no relatado trabalho, as correlações entre os leucócitos do leite e sangue não foi realizada, podendo ter existido aí outro fator que não a migração leucocitária.

No presente trabalho, o que se observou foi que os leucócitos totais do sangue aumentaram com o avançar da lactação, fenômeno este também ocorrido no leite, com o aumento das células somáticas durante as fases da lactação. Tanto no leite quanto no sangue, o neutrófilo foi o tipo celular mais encontrado, predominando no leite na fase inicial e no sangue na fase final da lactação. Os valores de linfócitos e monócitos no leite foram praticamente os mesmos durante a lactação, com maiores valores de monócitos, sendo este um leucócito com papel importante no mecanismo de defesa da glândula mamária, conforme já especificado. Com relação aos valores de monócitos e eosinófilos no sangue, não se observaram diferenças entre os valores durante as fases, somente existindo variações individuais dos animais.

7 CONCLUSÕES

- 1) Nas amostras de leite analisadas, houve um maior número de amostras com escore negativo ao CMT e um menor número de amostras com escore 3+.
- 2) Na contagem celular automática, o número de células somáticas do leite variou de 181.000 células/mL a 5.542.000 células/mL, e na contagem microscópica direta, o número de células variou de 74.991 a 5.049.394 células/mL, correspondendo, respectivamente, aos escores negativo e 3+, ou seja, observou-se aumento de celularidade com o aumento da positividade ao CMT.
- 3) Os valores medianos obtidos na contagem celular automática foram de 159.500; 508.000 e 277.500 células/mL de leite nas fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente, observando-se maior valor na fase intermediária quando comparada à fase inicial da lactação.
- 4) Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas, pela microscopia direta foram de 62.493; 89.275 e 146.411 células/mL, respectivamente, nas fases inicial, intermediária e final da lactação, não havendo diferenças estatisticamente significantes, mas com valores crescentes com o avançar da lactação.
- 5) Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas pelo método automático e pela microscopia direta apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).
- 6) Os valores medianos totais obtidos através das contagens celulares por método automático e microscopia direta obtiveram correlação positiva ($r = 88\%$).

- 7) Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a contagem de células somáticas nas glândulas direita e esquerda.
- 8) Não houve diferença significativa entre os valores percentuais médios dos diferentes leucócitos presentes no leite durante as fases da lactação, bem como, entre as glândulas direita e esquerda dos valores relativos da contagem diferencial de leucócitos.
- 9) Os valores percentuais médios e respectivos desvios-padrão dos diferentes tipos de leucócitos do sangue foram de $56,8 \pm 11,8\%$; $38,5 \pm 11,8\%$; $2,8 \pm 1,7\%$ e $1,9 \pm 1,6\%$ para neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, respectivamente.
- 10) Não houve correlação entre os diferentes tipos de leucócitos encontrados no leite e no sangue.
- 11) Não houve diferença estatística entre os leucócitos totais presentes no sangue durante as fases da lactação, apesar de apresentarem aumento gradativo entre as fases.
- 12) Os valores relativos de neutrófilos no sangue apresentaram maior valor na fase final da lactação, havendo diferença estatística quando comparada às fases inicial e intermediária.
- 13) Os valores relativos de linfócitos no sangue apresentaram menor valor na fase final da lactação, havendo diferença estatística quando comparada às fases inicial e intermediária.
- 14) Não houve diferenças estatísticas entre os valores relativos de monócitos e eosinófilos no sangue durante as fases da lactação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, P. V. P.; SOUZA, M. R.; BORGES, I.; PENNA, C. F. A. M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina e Zootecnia**, v. 53, n. 3, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 25 ago. 2003.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. R.; SOUZA, G. N. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1497-1500, 2004.

BARBOSA, G. M. O.; NUNES PINHEIRO, D. C. S.; LOBO, R. N. B.; SANTIAGO, E. K. S.; COSTA, L. A. C. Contagem total e diferencial de leucócitos no leite de cabra da raça Saanen sem sinais clínicos de mastite. **Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 73-77, 2001.

BARBOSA, D.A.; BLAGITZ, M.G.; KITAMURA, S.S.; GOMES, V.; BASTOS, C.R.; BENITES, N.R.; VERÍSSIMO, C.J.; MADUREIRA, K.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Comparação entre a contagem de células somáticas em leite de ovinos empregando técnicas direta e indireta. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71 (suplemento), p. 203-206, 2004.

BARROS, G. C.; LEITAO, C. H. S. Influência da mastite sobre as características físico-químicas de leite de cabra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 3/4, p. 45-48, 1992.

BENESI, F.J. Valores hematológicos de animais domésticos normais, criados em São Paulo. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M.K.; VASCONCELOS, S.A.; LARSSON, C.E.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p.36-69.

BIRGEL, E. H. **Contribuição ao estudo do quadro leucocitário sanguíneo de caprinos (Capra hircus) normais, criados no Estado de São Paulo**: influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1969.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M.K.; VASCONCELOS, S.A.; LARSSON, C.E.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-49.

BIRGEL, E. H. Enfermidades da glândula mamária dos caprinos. In: **Manejo, patologia e clínica de caprinos**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p. 253-328, 1985.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. **Medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978, p. 871.

CARLSON, G. P.; KANEKO, J. J. Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 421, 1975.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; MARCO, J. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 21, p. 259-264, 1996.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984. 1354 p.

COWAN, S. T. **Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1985.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat population. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 7, p. 713-719, 1981.

DAS, N.; SINGH, M. Variations in blood leucocytes, somatic cell count, yield and composition of milk of crossbred goats. **Small Ruminant Research**, v. 35, p. 169-174, 2000.

DEGRAVES, F. J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. In: Update on bovine mastitis. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 9, n. 3, p. 421-433, 1993.

DEVENDRA, C.; BURNS, M. **Goat production in the tropics**. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983, 183 p.

DRAKE, E. A.; PAAPE, M. J.; DICARLO, A. L.; LEINO, L.; KAPTURE, J. Evaluation of bulk tank goat milk samples. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 31., 1992, Arlington, VA. **Proceedings ... Arlington, VA, 1992**. p. 236.

DROKE, E. A.; PAAPE, M. J.; DICARLO, A. L. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 4, p. 1035-1039, 1993.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; SCHULTZE, W. D.; WEINLAND, B. T. Effect of parity stage of lactation, and intramamary infection. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 11, p. 2426-2433, 1983.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WEINLAND, B. T. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 1247-1251, 1982.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WERGIN, W. P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 5, p. 435-439, 1982.

FAO. Faostat agriculture data (**Agricultural production – live animals**). Disponível em :<<http://appa.fao.org>>. Acesso em: 18 ago. 2004.

FERNANDES, M.A. **Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras saanen e alpina, criadas no Estado de São Paulo**. 2002. 152 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FURTADO, M. M. Leite de cabra: características especiais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 36, n. 214, p. 31-37, 1981.

GOMES, V. **Influência do estágio de lactação na secreção láctea de cabras (Capra hircus) Saanen**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GONZALO, C. Microbiological and hygienic quality of ewe and goat somatic cells and pathogens. In: SEMINAR ON PRODUCTION AND UTILIZATION OF EWE AND GOAT MILK, 2., 1995, Crete. **Proceedings...** Brussels: International Dairy Federation, 1995. p. 59-70.

GRUNERT, E. Sistema Genital Feminino. In: ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 299-314.

GUIDRY, A.J.; PAAPE, M.J.; PEARSON, R.E. Effects of Parturition and Lactation on Blood and Milk Cell concentrations, corticosteroids, and Neutrophil Phagocytosis in the Cow. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 10, p. 1195-1200, 1976.

HAENLEIN, G. F. W.; KRAUSS, W. C. Effects of single injections of diethylstilbestrol on milk composition and count leucocytes in milk Holstein-Friesian cattle. **Z. Tierphysiol. Tierernaehr**, v. 34, p. 50-60, 1974.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-112, 1994.

HINCKLEY, L. S. Somatic cell count in relation to caprine mastitis. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, v. 78, n. 8, p. 1267-1271, 1983.

IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>>. Acesso em 22 nov. 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Laboratory methods for use in mastitis work**. Brussels, 1981. 27 p. (Bulletin, 132).

JAIN, N.C. Clinical interpretation of changes in leucocyte numbers and morphology. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. Lea e Febiger, Philadelphia, PA., 1986.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians & Wilkians, 1984. 787 p.

LENNETTE, E. M.; BALOWS, A.; HANSLER JR., W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1985. 1149 p.

LEWTER, M. M.; MULLOWNEY, P. C.; BALDWIN, E. W.; WALKER, R. D. Mastitis in goat. **The Compendium Continuing Education**, v. 6, n. 7, p. 417-425, 1984.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A. N. Estudo comparativo entre algumas características físico-químicas, celulares e bacteriológicas do leite de cabras reagentes e negativas ao Califórnia Mastitis Test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 3, p. 290-300, 1994.

NORD, K.; ADNOY, T. Effects of infection by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on Milk production of goats. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2391-2397, 1997.

MCDUGALL, S.; VOERMANS, M. Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. **Journal Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 378-383, 2002.

PAAPE, M. J.; CAPUCO, A. V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 565, 1996.

PAAPE, M. J.; HAFS, H. D.; SNYDER, W. W. Variation of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright stain or pyronina Y-methyl green stain. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 11, p. 1211-1216, 1963.

PAAPE, M. J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J. C.; CAPUCO, A. V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 237-244, 2001. Supplement E.

PAAPE, M. J.; WERGIN, P. The leukocyte as a defense mechanism. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 170, p. 1214-1223, 1977.

PARK, Y. W.; HUMPHREY, R. D. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat, and protein. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 32-37, 1986.

PERRIN, G. G.; BAUDRY, C. Numérations cellulaires du lait de chevre. **Le lait**, v. 73, n. 5-6, p. 489-497, 1993.

PETTERSEN, K. Cell content in goats milk. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 22, p. 226-237, 1981.

PRATA, L. F.; RIBEIRO, A. C.; REZENDE, K. T.; CARVALHO, M. R. B.; RIBEIRO, S. D. A.; COSTA, R. G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (saanen). Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 18, n. 4, p. 428-432, 1998.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infection Disease**, v. 7, p. 632-40, 1910.

POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2575-2576, 1983.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, W. B.; FETROW, J. Herd health: **Food Animal Production Medicine**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. **Reproduction. Nutrition. Development**, v. 43, p. 439-457, 2004.

RASTOGI, S.K.; SINGH, S.P. Normal hemogram and blood analytes of mountain Gaddi goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 60, n. 11, p. 1338-1339, 1990.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROTA, A.M.; RODRIGUEZ, P.; ROJAS, A.; MARTIN, L.; TOVAR, J. Evolution of the quantitative and quality characteristics in the goat milk (Verata breed) through the lactation. **Archive Zootecnia**, v. 42, p. 137-146, 1993.

ROTA, A. M.; ROJAS, A.; MARTIN, L.; RODRIGUEZ, P.; TOVAR, J. J. Uso de la prueba de California para la deteccion de mamits en el ganado caprino. **Avances en Alimentación y Mejora Animal**, v. 2, n. 34, p. 67-69, 1994.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Cary: SAS Institute, 2001. 956 p.

SANCHÉZ, A.; CONTRERAS, J.C.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. **The Veterinary Record**, June 9, p. 711-714, 2001.

SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**: physical and chemical tests for detection of mastitis. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. p. 128-157

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C. Diferential cell counts in goat's milk. In: MILKING AND MILKING PRODUCTION OF DAIRY SHEEP AND GOATS, 1998, Athens. International Symposium on the Milking of Small Ruminants, 6, 1999, **Proceedings...** Athens: Wageningen, 1999, p. 178-180.

SILVA, E. R. **Estudo de algumas fontes de variação do conteúdo celular do leite de cabra**. 1997. 62 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 1997.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SAUKAS, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a contagem de células somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em 22 set. 2004.

SILVA, E. R.; SAUKAS, T. N.; ALVES, S. F. A.; PINHEIRO, R. R. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 2, 1996.

SMITH, M.C.; ROGUINSKY, M. Mastitis and other disease of the goat's udder. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 171, p. 1241-1248, 1977.

STEHLING, R. N.; VARGAS, O. L.; SOUZA, H. M.; PORTUGAL, H. T. B. Relação entre a contagem microscópica direta e os testes "California Mastitis Test" e "White Side" na determinação de células somáticas em leite caprino. **Revista do Laticínio Cândido Tostes**, v. 43, n. 258, 1988.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo; Roca, 2002, 532 p.

THOMPSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 411.

WHITE, E. C.; HINCKLEY, L. S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 33, p. 117-121, 1999.

ZENG, S. S. Comparasion of goat milk standards with cow milk standads for analysis of somatic cell count, fat and protein in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 21, n. 3, p. 221-225, 1996.

ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N.; HART, S. P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G. T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing

laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 31, p. 103-107, 1999.

ANEXO A - SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA (PBS)

Cloreto de Sódio: 8.0 g

Fosfato monobásico de potássio: 0.2 g

Fosfato bibásico de sódio dodecahidratado: 2.8 g

Cloreto de potássio: 0.2 g

Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL

Acertar o pH para 7.4

A solução final preparada encontra-se concentrada 10 vezes. No momento do uso, a mesma deve ser diluída na proporção de 1:10 em água Milli-Q, mantendo-se o pH entre 7.2 e 7.4

ANEXO B - SOLUÇÃO DE CARNOY'S

Ácido acético glacial: 100 mL

Clorofórmio: 300 mL

Etanol P.A.: 600 mL

ANEXO C - CORANTE DE ROSENFELD

Giemsa em pó: 0.97 g

May Grunwald: 0.53 g

Metanol p.a. q.s.p. 1000 mL

Deixar dissolver durante 2 dias e depois filtrar