

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VALOR DA HAPTOGLOBINA NO PLASMA COMPARADO COM A CONTAGEM
DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE
SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

MARCELO FERNANDO COLLA
PORTO ALEGRE/RS
Março/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VALOR DA HAPTOGLOBINA NO PLASMA COMPARADO COM A CONTAGEM
DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE
SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

Autor: Marcelo Fernando Colla
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de
Patologia Clínica.
Orientador: Félix Hilário Diaz
González

PORTO ALEGRE

2009

MARCELO FERNANDO COLLA

VALOR DA HAPTOGLOBINA NO PLASMA COMPARADO COM A CONTAGEM
DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE
SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

Aprovada em: 31 de Março de 2009.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix Hilário Diaz Gonzalez
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Cruz, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão

Prof. Dr. Márcio Nunes Correa, Universidade Federal de Pelotas
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz e Isolde e minha irmã Vanessa, pelo total apoio, amor, incentivo, compreensão e por acreditarem no meu potencial.

A minha namorada Katrin que soube entender os momentos de impaciência e falta de ânimo, dando apoio e incentivo nos momentos em que mais precisei.

Às pessoas que me propiciaram este salto na minha profissão, um agradecimento especial a Félix Hilário Diaz. González, João Walter Dürr e Stella Faria Valle.

Aos meus amigos que moram em Porto Alegre, que me deram um total apoio na hora que mais precisei.

Aos meus amigos do peito que para mim são especiais: Felipe, Gustavo e Rafael Bilhar e Tiago Golo, pela paciência, disponibilidade e solidariedade. Muito obrigado.

À Universidade de Passo Fundo na figura do SARLE e do Laboratório de Análises Clínicas da UPF, que me auxiliaram em tudo que precisei.

Às minhas tias Nelcy, Adelina e Tere que de uma maneira ou outra sempre me estenderam a mão, e muitas vezes me deram suporte para continuar minha jornada.

Aos produtores rurais que acreditaram e entenderam a importância da pesquisa, disponibilizando os animais para coleta de amostras.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar um curso de Pós-Graduação de qualidade e gratuito.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Principais fatores que afetam o conteúdo de gordura no leite.....	18
TABELA 2-	Grupos estabelecidos para o experimento de acordo com a CCS e CBT, e a presença de sinais clínicos de mastite.....	35
TABELA 3 -	Média e desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) obtidas das amostras de leite de vacas da raça Holandesa no noroeste do Rio Grande do Sul.....	39
TABELA 4 -	Média e desvio-padrão de lactose, gordura, proteína e sólidos totais no leite de vacas da raça Holandesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).....	41
TABELA 5 -	Média e desvio-padrão dos níveis de proteína plasmática total (PPT) fibrinogênio e Haptoglobina (Hp) de vacas da raça Holandesa conforme a CCS.....	44
TABELA 6 -	Média e desvio-padrão dos níveis do Hematócrito, leucócitos totais, monócitos e basófilos no sangue de vacas da raça Holandesa conforme a CCS	47

**VALOR DA HAPTOGLOBINA COMPARADO COM A CONTAGEM DE
CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE
SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS**

MARCELO FERNANDO COLLA

Félix H. Diaz González (Orientador – UFRGS)

RESUMO

A contagem de células somáticas (CCS) é o padrão ouro de avaliação da integridade da glândula mamária e da qualidade do leite. A haptoglobina (Hp) é uma das principais proteínas de fase aguda que se eleva em processos inflamatórios, infecciosos e de estresse em ruminantes. Este estudo avaliou a relação entre os níveis séricos de Hp e a CCS, através de coletas de amostras de leite e sangue de vacas leiteiras de rebanhos do Noroeste do estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram obtidas, entre fevereiro e outubro de 2008 de 150 animais da raça Holandesa, sem distinção de idade e número de lactação, divididos em três grupos de 50 animais separados conforme o valor da CCS. O grupo 1 (G1) incluiu vacas com CCS abaixo de 600.000 cel/mL; o grupo 2 (G2), vacas com CCS superior a 600.000 cel/mL e, o grupo 3 (G3), vacas que apresentavam sinais clínicos de mastite. Para cada amostra de leite, foi determinada a CCS, a contagem bacteriana total (CBT) e os níveis de proteína, gordura, lactose e sólidos totais. Coletou-se 5 mL de sangue através de punção da veia coccígea para avaliar contagem total e diferencial de leucócitos, fibrinogênio, hematócrito, proteínas plasmáticas totais e haptoglobina. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os três grupos quanto à CCS, CBT e lactose. A proteína apresentou diferença significativa entre G1 para G2 e G3. Nos sólidos totais, G1 e G2 apresentaram diferença significativa para G3. A gordura não apresentou diferença significativa entre os grupos. Análises não paramétricas demonstraram forte correlação positiva entre CCS e CBT ($r=0,852$, $P<0,005$). Quanto às análises hematológicas, o leucograma e as proteínas plasmáticas totais não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Fibrinogênio e hematócrito se diferenciaram estatisticamente nos grupos 1 e 3. Na análise do diferencial, os monócitos do G1 e G3 apresentaram diferença estatística para G2. Além disso, o fibrinogênio apresentou correlação leve, mas significativa ($r= 0,270$, $P<0,001$), em relação ao valor de CCS. Análises não paramétricas apresentaram correlação média entre CCS e concentração de Hp ($r= 0,357$, $P<0,001$), demonstrando associação entre as variáveis. Quanto à concentração de Hp, houve diferença significativa do G1 (0,41 g/L) e G2 (0,41 g/L) para G3 (0,70 g/L), ou seja, se comprovou a elevação dos níveis séricos de Hp em vacas com processo inflamatório instalado; entretanto, a Hp não se mostrou sensível para detecção de mastite subclínica. Sugere-se que estudos adicionais possam elucidar tais associações.

Palavras-chave: contagem de células somáticas, resposta de fase aguda, mastite.

ABSTRACT

Somatic cell count (SCC) is the gold standard of both the mammalian gland and milk quality evaluation. The haptoglobin (Hp) is one of the main acute phase proteins, which increase in inflammation, infectious and stress processes of ruminants. This work evaluated the relation between Hp serum level and SCC, through the analysis of milk and blood samples from dairy cows from herds in the northwest Rio Grande do Sul state. Samples were obtained, between February and October 2008, from 150 Holstein cows, without age or milking number discrimination and that were separate in three different groups with 50 animals each, according SCC value. Group 1 (G1) included cows with SCC below 600.000 cells/mL; group 2 (G2), cows with SCC above 600.000 cells/mL and group 3 (G3), cows with signs of clinical mastitis. For each milk sample, it was determined SCC, total bacteria count (TBC), and the protein, fat, lactose, and total solid contents. A 5 mL blood sample was collected by puncturing coccygeal vein to evaluate total and differential leucocytes counts, fibrinogen, hematocrit, total serum protein, and haptoglobin. Statistic analysis showed significant differences among the three groups for SCC, TBC, and lactose. The protein average showed significant difference among G1 to G2 and G3. Total solid contents from G1 and G2 were significantly different to that from G3. Fat content had not significant differences among groups. Not parametric analysis demonstrated strong positive association between SCC and TBC ($r= 0,852$, $P< 0,005$). For the hematological analysis, leucograma and total serum protein had no significant differences among groups. Both, fibrinogen and hematocrit showed statistical differences in G1 and G3. Regarding the differential analysis, the monocytes of G1 and G3 showed statistical differences to that of G2. Moreover, although short, there was significant correlation ($r= 0,270$, $P<0,001$) between fibrinogen and SCC. Not parametric analysis displayed mean correlation between SCC and Hp concentration ($r= 0,357$, $P<0,001$), demonstrating association between the variables. For the concentration of Hp, there was significant differences between G1 (0,41 g/L) and G2 (0,41 g/L) to G3 (0,70 g/L) proving the Hp increase in cows affected by clinical mastitis; nevertheless, the Hp was not a sensible marker to subclinical mastitis. It is suggested that further studies may elucidate those associations.

Key-words: *somatic count cells, acute phase response, mastitis.*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Mastite bovina	12
3.2 Contagem de células somáticas (CCS).....	13
3.3 Contagem bacteriana total (CBT).....	15
3.4 Lactose.....	16
3.5 Gordura.....	17
3.6 Proteína.....	19
3.7 Sólidos totais do leite.....	20
3.8 Aspectos hematológicos dos bovinos.....	22
3.9 Hemograma.....	22
3.10 Fibrinogênio.....	23
3.11 Células de defesa do organismo.....	24
3.11.1 Basófilos.....	24
3.11.2 Eosinófilos.....	25
3.11.3 Linfócitos.....	26
3.11.4 Monócitos.....	28
3.11.5 Neutrófilos.....	29
3.12 Haptoglobina (Hp).....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Seleção dos animais e identificação dos grupos.....	34
4.2 Amostras de leite.....	35
4.3 Amostras de sangue.....	36
4.4 Determinação da Haptoglobina no plasma.....	37
4.5 Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Propriedades do leite.....	38
5.2 Perfil protéico das amostras.....	43
5.3 Perfil hematológico das amostras.....	47
6. CONCLUSÕES.....	49
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	50
ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da pecuária leiteira na região Noroeste do Rio Grande do Sul, as exigências quanto à manutenção do controle higiênico-sanitário do rebanho bovino têm se tornado mais rigorosa. Entre os objetivos de tal controle, inclui-se a conservação das propriedades físico-químicas do leite e, conseqüentemente, da qualidade do produto. Dentre as possíveis causas de alterações nas propriedades físico-químicas do leite está a mastite que se caracteriza pela inflamação do parênquima da glândula mamária (RADOSTITS *et al.*, 2000). As mastites podem ser classificadas em subclínica e clínica (subaguda, aguda e hiperaguda) e, quanto à duração, em curto prazo, clinicamente recorrente e subclínicamente persistente. Seja qual for a classificação e o período de duração da doença, as mastites estão entre as principais responsáveis pelas perdas econômicas na produção leiteira bovina (CHAGUNDA *et al.*, 2006). O animal acometido por mastite apresenta redução na produção de leite devida às alterações locais produzidas pela penetração de patógenos pelo canal do teto e que atingem cisternas e alvéolos do úbere. Durante a penetração dos microorganismos, há destruição de células secretoras, alteração da permeabilidade dos capilares locais e extravasamento de componentes (inclusive leucócitos) sanguíneos para o interior da glândula mamária (WATTIAUX, 1996). Além destas, há alterações nos níveis de macro (gordura, proteína, lactose) e microconstituintes (minerais) do leite devido à alteração da permeabilidade dos capilares sanguíneos e à redução da capacidade de síntese das células secretoras (PEREIRA *et al.*, 1999).

A inflamação da glândula mamária quase sempre é de caráter infeccioso. Dentre os agentes etiológicos isolados de casos de mastite subclínica, destacam-se os estafilococos coagulase positiva, como o *Staphylococcus aureus* e as bactérias do gênero *Corynebacterium* spp (ZAFALON *et al.*, 2005). Segundo Detilleux *et al.* (2006), *Escherichia coli* é importante patógeno causador da mastite clínica, com rápido

desenvolvimento de sinais clínicos após inoculação. Na mastite clínica, os sinais mais comumente observados no úbere são secreções e tamanho anormais, dor, endurecimento, além de consistência e temperatura aumentadas. No leite, ocorre o aparecimento de grumos, alto número de leucócitos e descoloração (RADOSTITS *et al.*, 2000). Grönlund *et al.*, (2005) indicam que a diferença entre mastite subclínica e clínica é a evidência dos sinais clínicos, que são facilmente observados através da inspeção e palpação do úbere nos casos de mastite clínica.

Para o diagnóstico de mastite subclínica são usados testes como Califórnia Mastite Teste (CMT) imediatamente antes da ordenha, ou contagem de células somáticas determinadas por contadores automáticos (GRÖNLUND *et al.*, 2005) ou métodos de execução à campo como Somaticell (Shering-Plough). A contagem de células somáticas é o melhor indicador do processo inflamatório da glândula mamária e pode indicar intensidade da defesa celular do leite, sem que haja sinais clínicos no úbere. A contagem basal de células somáticas analisadas diretamente de um úbere saudável exibe variação entre 50.000 e 200.000 células/mL e pode ser influenciada pela idade do animal. Vacas com mastite subclínica podem excretar valores acima de 1.000.000 de cel/mL, mas normalmente esses valores giram em torno de 200.000 e 500.000 cel/mL (URECH *et al.*, 1999; COLDEBELLA *et al.*, 2004). Vacas saudáveis apresentam um número reduzido de células, freqüentemente valores que não ultrapassam 50.000 cel/mL (MAGALHÃES, 2006). Um quarto mamário apresenta mastite subclínica quando a CCS for igual ou superior a 300.000 cel/mL (PITKALA *et al.* 2004). No entanto, Coldebella *et al.* (2004) verificaram perdas de produção dos componentes do leite a partir de 17.000 cel/mL, independentemente da quantidade de leite produzido. Os limites de aceitação de CCS para a indústria do leite variam de acordo com cada país e se situa entre 400.000 a 750.000 cel/mL. Na Comunidade Européia e Nova Zelândia, por exemplo, os níveis de CCS são inferiores a 400.000 cel/mL; no Canadá, alcançam 500.000 cel/mL e, nos Estados Unidos, 750.000 cel/mL (BRITO & BRITO, 1998). No Brasil, a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil (BRASIL, 2002) estabelece CCS máxima de 600.000 cel/mL nos requisitos para leite tipo A.

Várias enfermidades em ruminantes, especialmente bovinos, envolvem modificações patognomônicas quantitativas ou morfológicas dos glóbulos vermelhos e/ou brancos, determinantes na utilização do exame sanguíneo como ferramenta de diagnóstico (STÖBER & GRÜNDER, 1993). O leucograma avalia alterações

quantitativas e/ou morfológicas das séries leucocitárias (STÖBER & GRÜNDER, 1993). Em ruminantes, casos de leucopenia aparecem de forma precoce em infecções bacterianas (mastite), apresentando também, linfopenia e neutropenia nos primeiros dias (JAIN, 1993).

Além das células sanguíneas, o organismo libera substâncias que atuam para manter a homeostasia. Em processos inflamatórios, há adaptação do metabolismo hepático para a resposta de fase aguda (PFA), ou seja, elevação na produção e secreção das proteínas de fase aguda no plasma, além do início de uma variedade de papéis na restauração da homeostasia (GRÖNLUND *et al.*, 2005; ECKERSALL *et al.*, 2006) após alterações externas ou internas tais como infecções, inflamações, traumas ou estresses. Citocinas como IL-1, IL-6 e FNT- α são liberadas pelos leucócitos na corrente sanguínea e estimularão o fígado à síntese e secreção de PFA no sangue (KANEKO, 1997; TIZARD, 1998; THOMAS, 2000).

Em bovinos, as duas PFA mais sensíveis são a haptoglobina (Hp) e a amilóide-A sérica (SAA). O fibrinogênio também é uma PFA produzida no fígado, em processos inflamatórios de inúmeras causas, sua concentração sérica pode se elevar e permanecer alta por vários dias ou semanas, como em casos de doenças crônicas (LOPES *et al.*, 2008). Em bovinos, o fibrinogênio pode ser um indicativo de uma resposta inflamatória ativa (KRAMER, 2000), no entanto, em doenças com excessivo depósito de fibrinogênio tecidual, sua concentração sanguínea pode estar diminuída (LOPES *et al.*, 2008). A concentração de Hp no soro sanguíneo dos bovinos se apresenta reduzida em situações fisiológicas normais. Por outro lado, há rápido aumento em sua concentração durante a fase aguda da inflamação e rápido decréscimo, quando o processo inflamatório cessa (NIELSEN *et al.*, 2004).

Apesar de ainda enfrentar restrições associadas especialmente com fatores políticos, sociais e de manejo nutricional dos rebanhos, o setor leiteiro gaúcho certamente se beneficiará com o desenvolvimento de técnicas aplicáveis no diagnóstico precoce de mastites. Neste sentido, ressalta-se a importância de métodos capazes de associar maior sensibilidade que bacteriologia e menor variabilidade ou interferência de fatores que contagem de células somáticas.

2. OBJETIVOS

- Estabelecer associação da presença de haptoglobina plasmática como indicador sensível e precoce para vacas leiteiras afetadas por mastite subclínica.
- Estabelecer a relação entre a concentração de haptoglobina com a contagem de células somáticas no leite.
- Determinar o valor diagnóstico da haptoglobina em mastites subagudas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mastite bovina

Com o intuito de manter a integridade da glândula mamária e as propriedades físico-químicas do leite, as exigências quanto ao controle higiênico-sanitário dos rebanhos leiteiros têm se tornado crescentemente mais rigorosa. Dentre as causas mais comuns de alterações nas propriedades do leite, encontra-se a mastite que se caracteriza pela inflamação do parênquima da glândula mamária (RADOSTITS *et al.*, 2000).

A mastite clínica apresenta sintomatologia característica de processos inflamatórios como dor, endurecimento, aumento no tamanho, consistência e secreção da glândula mamária e conseqüentemente pode haver desenvolvimento de reações sistêmicas (LADEIRA, 2003). Os sinais mais evidentes de mastite clínica no leite são descoloração da amostra, coágulos, grumos, pus ou sangue (RADOSTITS *et al.*, 2000). A mastite provoca alterações na composição do leite pelo aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos na glândula mamária, pelos distúrbios na capacidade de síntese do tecido secretor e por ação direta dos patógenos ou enzimas sobre os componentes já secretados no interior da glândula (MACHADO *et al.*, 2000). O que diferencia a mastite subclínica da clínica é a presença dos sinais clínicos característicos de inflamação na glândula mamária. Nos casos em que não há sinais clínicos, a anormalidade mais freqüente do leite é a elevação do número de células de defesa (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e poucas células do tecido epitelial) (RADOSTITS *et al.*, 2000). A mastite subclínica é branda e de difícil diagnóstico clínico pelo fato do animal não apresentar sinais característicos da enfermidade, ou seja, a vaca se apresenta sadia, o úbere não apresenta nenhum sinal de inflamação e aparentemente, o leite está normal (WATTIAUX, 1996). Nesses casos, o leite é a única forma de diagnosticar as alterações

de mastite subclínica através das análises de CCS por citometria de fluxo e do *California Mastitis Test* (CMT) realizado no momento da ordenha (GRÖNLUND *et al.*, 2005).

O CMT serve como ferramenta de auxílio para estipular, aproximadamente, a quantidade de CCS no leite, determinando indiretamente a integridade da glândula mamária e a qualidade do alimento (DÜRR, 2005; GOMES *et al.*, 2006). O teste é realizado com o auxílio de uma raquete que possui quatro compartimentos, onde o leite de cada um dos quatro quartos da vaca é instilado diretamente e posteriormente misturado ao reagente (DÜRR, 2002). A interpretação do CMT exige experiência do operador para que reações discretas não passem por leite sem alterações (BRITO *et al.*, 1997; DELLA LIBERA *et al.* 2001; ZAFALON *et al.*, 2005). As amostras são consideradas positivas quando as misturas leite e reagente apresentam a formação de gel viscoso e coágulos acompanhados por coloração violeta, atribuindo-se um escore de um a cinco para a amostra, em resposta ao grau do processo inflamatória. O escore mínimo indica a ausência de coágulos e o máximo, indicando a coagulação bem visível de praticamente todo o leite do compartimento (DÜRR, 2002; ZAFALON *et al.*, 2005).

Há correlação positiva entre CMT e a quantidade de células somáticas (BARBOSA *et al.*, 2002), especialmente em amostras com CCS maiores que 500.000 cel/mL (DELLA LIBERA *et al.*, 2001). Amostras de leite que apresentaram CCS acima de 500.000 cel/mL, foram também positivas para o CMT, teste que ainda se mostra sensível e de baixo custo para o diagnóstico de mastite subclínica em análises feitas à campo, quando comparadas com o teste *whiteside* (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2008). Entretanto, Zafalon *et al.* (2005) observaram maior especificidade e eficiência no diagnóstico de mastite subclínica causada por *S. aureus* e *Corynebacterium* spp quando utilizado o teste de CCS em comparação ao CMT, utilizando um limiar de 200.000 cel/mL entre quartos sadios e doentes.

3.2 Contagem de células somáticas (CCS)

As células somáticas são todas as células presentes no leite, incluindo as originárias da corrente sanguínea como os leucócitos e as células de descamação do epitélio glandular secretor (DÜRR, 2002, MULLER, 2002). Portanto, a CCS inclui

células de defesa do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária, com o objetivo de combater os agentes causadores da mastite (MACHADO *et al.*, 2000). Desta maneira, o número de CCS no leite demonstra o grau de infecção presente na glândula mamária.

No Brasil, os limites de CCS variam de acordo com cada região do país. A Instrução Normativa número 51 (IN51) do MAPA estabelece que em propriedades rurais e/ou em tanques comunitários, o nível de CCS não pode ultrapassar um milhão de células/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste até julho de 2008 e para as regiões Norte e Nordeste, até julho de 2010. Após essas datas, os índices devem diminuir a patamares inferiores a 750 mil cel/mL nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste entre julho de 2008 a julho de 2011 e, nas regiões Norte e Nordeste, de julho de 2010 a julho de 2012. A partir de então, os níveis aceitáveis de CCS devem atingir escore máximo de 400 mil cel/mL para as respectivas regiões (BRASIL, 2002).

A CCS é determinada através de citometria de fluxo que, com o auxílio de produtos químicos como o brometo de etídio, marca o DNA nas células somáticas do leite, as quais por tornarem-se fluorescentes, emitem um *flash* de luz, que passará por uma série de filtros ópticos que as contarão (Somacount 300, Bentley Instruments, EUA). Alguns fatores externos favorecem a elevação da CCS no leite. Períodos mais quentes como outono e verão são associados com maiores CCS, enquanto que nos meses mais frios, os valores são mais brandos (BUENO *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2006; BORGES & ZANELA, 2008). Por outro lado, Cunha *et al.* (2008) constataram aumento no escore de CCS associado com aumento da ordem de lactação, além de decréscimos na produção leiteira conforme elevação da CCS a partir de 100.000 cel/mL. Aumentos de CCS superiores a 200.000 cel/mL são associados com diminuição nos teores de proteína, lactose e sólidos totais (BUENO *et al.*, 2005).

Segundo Tozzetti *et al.* (2008), rebanhos sadios apresentam índices celulares inferiores a 100.000 cel/mL, mas valores CCS superiores a 500.000 cel/mL indicam infecções subclínicas atuantes e perdas de, pelo menos, 10%, tanto na produção quanto na qualidade do leite. Cuidados de higiene durante a ordenha associados a um programa adequado de controle de mastites e de manutenção da ordenhadeira auxiliam na diminuição de CCS.

3.3 Contagem bacteriana total (CBT)

As bactérias utilizam os componentes do leite como alimento e causam prejuízos para produtores, indústrias e consumidores (DÜRR, 2005). A presença excessiva tem efeitos negativos sobre a qualidade do leite, especialmente no sabor, vida de prateleira e segurança alimentar do produto disponibilizado ao consumidor (GUIMARÃES *et al.*, 2006). A determinação da contaminação bacteriana pode ser realizada pela contagem bacteriana total (CBT), através de metodologia automatizada denominada de citometria de fluxo que expressa a quantidade de bactérias em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

A contaminação do leite dentro da própria glândula mamária, a higiene dos utensílios e dos equipamentos de ordenha, a qualidade da água para limpeza dos equipamentos e lavagem dos tetos, são fatores que determinam o nível inicial de contaminação no leite (PALES *et al.*, 2005). No Brasil, os limites recomendados de CBT variam de acordo com As regiões do país. Conforme a Normativa Número 51 do MAPA, para propriedades rurais e tanques comunitários o nível de CBT estipulado é de um milhão de UFC/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste até primeiro de julho de 2008, e até primeiro de julho de 2010 para as regiões Norte e Nordeste. No entanto, após essas datas os índices devem diminuir a patamares inferiores a 750 mil UFC/mL nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste entre primeiro de julho de 2008 e primeiro de julho de 2011 e, nas regiões Norte e Nordeste, de primeiro de julho de 2010 à primeiro de julho de 2012. A partir de então, os níveis aceitáveis de CBT devem ter escore máximo de 300 mil UFC/mL para leites de conjunto e 100 mil UFC/mL para leites individuais nas respectivas regiões (BRASIL, 2002).

De acordo com Santos & Fonseca (2007), uma vaca com mastite clínica causada por bactérias *Streptococcus* sp. pode liberar no leite até 10.000.000 UFC/mL, elevando de forma substancial os valores de CBT no tanque resfriador. Perdas econômicas podem ser atribuídas a níveis elevados de CBT. Bueno *et al.* (2008) observaram uma diminuição nos teores de lactose e pequenas alterações nos valores de gordura, proteínas e sólidos totais, conforme o aumento da contaminação bacteriana em tanques de refrigeração. Entretanto, Guerreiro *et al.* (2005) constataram que a adoção de cuidados quanto aos utensílios e equipamentos, higiene dos ordenhadores, cuidados com o

ambiente e manejo adequado dos animais pode diminuir significativamente a contagem bacteriana total da propriedade.

3.4 Lactose

A lactose é um dissacarídeo formado a partir de uma molécula de glicose e outra de galactose e é considerado o principal carboidrato encontrado no leite (SILVA, 1997; NORO & GONZÁLEZ, 2001; STABENFELDT & DAVIDSON, 2004). Conforme Silva (1997), Noro & González (2001) e González & Campos (2003), a lactose é o componente que sofre menor variação em sua concentração no leite bovino (4,6 a 5,2%). González (2001), Wattiaux & Armentano e (2000) Rigout *et al.* (2002) citam que a lactose é a principal responsável pela osmorregulação do leite. A glicose pode ser um fator limitante para a máxima secreção de leite, pois é a principal precursora molecular da lactose nas células epiteliais da glândula mamária, em animais lactantes (GONZÁLEZ, 2001; ZHAO & KEATING, 2007). A síntese permanece temporariamente inativa até imediatamente antes do parto, isso porque a progesterona inibe a formação de uma proteína denominada β -lactalbumina, proteína do soro do leite (GONZÁLEZ & CAMPOS, 2003).

O processo de formação da glicose inicia pela fermentação dos carboidratos provenientes da dieta, no rúmen, que conseqüentemente produzem ácidos graxos voláteis, especialmente o propionato que, juntamente com aminoácidos glicogênicos serão sintetizados no fígado através da gliconeogênese (WATTIAUX & ARMENTANO, 2000). Parte dessa glicose formada é disponibilizada para as células da glândula mamária para a formação de lactose. De acordo com DeFrain *et al.* (2004), o aumento ruminal de propionato é usado como meio de maximizar precursores para a gliconeogênese hepática. Segundo Fontaneli & González (2001), o ácido propiônico também é utilizado para a biossíntese da galactose, que juntamente com a glicose darão origem à lactose na glândula mamária. Xiao & Cant (2005) indicam que cerca de 85% da glicose no corpo é direcionada para a glândula mamária para a síntese de lactose. Isso significa que em vacas que produzem 40 litros de leite por dia, a glândula mamária necessita de, aproximadamente, três quilos de glicose diariamente (ZHAO & KEATING, 2005).

Nos casos de mastite, a porcentagem de lactose está reduzida devido à queda em sua síntese pela destruição do tecido secretor da glândula mamária associada à perda de lactose para corrente sanguínea pelo aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue. Além disso, há utilização de lactose pelos patógenos intramamários (PRADA e SILVA *et al.*, 2000). Segundo Sharer *et al.* (2003), a lactose pode acelerar o crescimento bacteriano no leite de animais com mastite causada por *Staphylococcus aureus*, relacionando o metabolismo dos carboidratos e a virulência da doença. Com o objetivo de identificar estratégias de prevenção para a doença, os autores observaram a implicação de enzimas específicas (lactose permease) com potencial fator de virulência em mastites. Machado *et al.* (2000) constataram alterações significativas nos constituintes do leite com CCS elevada, onde a concentração de lactose apresentou diminuição em leites de tanques de refrigeração com CCS igual ou superior a 500.000 cel/mL. Resultados similares foram observados por Bueno *et al.* (2008). Ogola *et al.* (2007) descrevem índices normais de lactose em amostras de leite de quartos mamários apresentando CCS inferior a 250.000 cel/mL e entre 250.000 cel/mL e 500.000 cel/mL, por outro lado valores entre 500.000 e 750.000 cel/mL ou superiores, demonstram uma queda significativa nos níveis de lactose. Similarmente, em estudo realizado por Gomes *et al.* (2006), houve decréscimo nos teores de lactose em amostras que apresentaram escore positivo ao CMT.

3.5 Gordura

As camadas de células do epitélio mamário possuem excelente organização e habilidade para converter os nutrientes provenientes da circulação em componentes do leite (BAUMAN *et al.*, 2006). Segundo Stabenfeldt & Davidson (2004) e Noro & González (2001), a gordura é a fonte de energia mais importante, abundante e variável de todos os componentes encontrados no leite. Sua concentração e composição sofrem maior influência pela nutrição e condições ambientais do que as demais frações do leite.

A gordura do leite é composta por vários lipídios, incluindo monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e esteróides (STABENFELDT & DAVIDSON, 2004). No entanto, os triglicerídeos são os principais componentes da gordura do leite, onde 50% são de cadeia carbonada curta e o restante

dos ácidos graxos de cadeia carbonada longa (TÉLLEZ & ROMERO, 2006). Stabenfeldt & Davidson (2004) referem que a gordura do leite bovino é uma mistura de triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia curta. Os ácidos graxos, o glicerol e outros intermediários são sintetizados no citosol e a biossíntese de triglicerídeos ocorre no retículo endoplasmático das células epiteliais mamárias. Para a síntese, os metabólitos circulantes no sangue são responsáveis pelo aporte de matéria prima (DÜRR, 2002). Os ácidos acético e butírico são os principais precursores da gordura na glândula mamária e são absorvidos pela mucosa das papilas ruminais (FONTANELI & GONZÁLEZ, 2001).

Entre os fatores que influenciam na quantidade de gordura do leite, destacam-se genética do animal, tipo de dieta, nível de produção, sazonalidade, período de lactação e gestação (DÜRR, 2002). Assim, o leite bovino contém de 3,5 a 4,5% de gordura, conforme fatores intrínsecos e extrínsecos (NORO & GONZÁLEZ, 2001; DÜRR, 2002; STABENFELDT & DAVIDSON, 2004; TÉLLEZ & ROMERO, 2006;). Alguns fatores nutricionais (Tabela 1) como o aumento de concentrado na dieta, a quantidade e o tamanho da fibra e a adição de tamponantes e compostos ionóforos, podem aumentar o teor de gordura no leite (GONZÁLEZ & CAMPOS, 2003). Por outro lado, Perfiled II *et al.* (2007) citam problemas que envolvem a inter-relação entre a fermentação bacteriana no rúmen e a síntese de ácidos graxos na glândula mamária como causa de depressão da gordura no leite.

Tabela 1. Principais fatores que afetam o conteúdo de gordura no leite.

Fatores que aumentam o teor de gordura	Fatores que diminuem o teor de gordura
Baixa produção de leite	Alta proporção de concentrados na dieta
Estágio avançado na lactação	Baixo teor de FDN efetiva (<21% da MS)
Alto teor de fibra na dieta (FDN > 35%)	Alto teor de carboidratos não estruturais na dieta
Fornecimento de gordura protegida	Alto teor de gordura insaturada na dieta
Inclusão de tamponantes na dieta	Utilização de ionóforos
Perda de peso excessiva no início da lactação	Alimentos muito moídos ou de rápida degradação

Fonte: Adaptado de Peres (2001).

Além dos efeitos nutricionais, o nível de CCS também pode influenciar no teor de gordura do leite. Pereira *et al.* (1999) relataram diferença significativa no teor de gordura no leite de animais com mastite (3,69%) e sem mastite (3,34%). O aumento na concentração de gordura pode ser ocasionado pela queda de produção do leite em decorrência da enfermidade. De acordo com Zafalon *et al.* (2007) apud Bansal *et al.* (2005), há contradição no teor de gordura do leite em animais com mastite. Enquanto danos no epitélio glandular e a redução da ação lipolítica das enzimas leucocitárias indicam uma diminuição na síntese de gordura, a queda na produção de leite explica a elevação do teor de gordura.

3.6 Proteína

As alterações no teor de proteínas no leite são menos significativas do que as alterações de gordura em decorrência da dieta e, embora influenciem a produção total, têm pequena variação no leite (DURR, 2002). As proteínas presentes no leite são denominadas de alfa, beta, gama e kappa caseína, lactoalbumina, beta-lactoglobulina, soroalbumina sanguínea, proteínas plasmáticas, aminoácidos livres e imunoglobulinas, que são provenientes dos peptídeos. A kappa caseína é a principal proteína, constitui cerca de 80% do leite e se diferencia das demais proteínas pela quantidade de aminoácidos (valina, leucina, ácido aspártico, tirosina e prolina) (TELLEZ & ROMERO, 2006).

De acordo com Fontaneli & González (2001), as células epiteliais secretoras da glândula mamária sintetizam proteínas a partir de aminoácidos e peptídeos presentes na corrente sanguínea que serão transaminados ou utilizados para síntese de glicose. Os valores normais de proteína no leite bovino variam entre 3,2 e 3,5%, dependendo da raça. Segundo Noro & González (2001), a caseína é uma proteína complexada com fosfolípidos que se encontra no leite em forma de micela e tem a função de servir como fonte de nutrientes como aminoácidos, cálcio e fosfatos de alta digestibilidade. Em casos de mastite, a estrutura da micela de caseína desestabiliza e ocorre hidrólise parcial da caseína, com diminuição de produção e qualidade do leite.

Em animais com mastite, o aporte de proteínas plasmáticas para a glândula mamária se eleva para combater a infecção. Quando o leite é processado na indústria,

essas proteínas são perdidas, enquanto a caseína que realmente interessa para a produção industrial diminui (PEREIRA *et al.*, 1999). Alguns fatores podem alterar a quantidade de proteína no leite. De acordo com Dürr (2002), o fator que causa maior variação é a quantidade de energia da dieta. Quando se aumenta o teor de concentrado em dietas deficientes em proteínas, aumenta o teor de proteína no leite. O mesmo não ocorre em dietas com níveis adequados de proteínas, ou quando se eleva o fornecimento das proteínas nas dietas acima dos níveis recomendados.

Doenças como a mastite podem influenciar na quantidade de proteína do leite. Vanlandingham *et al.* (1940) estudaram a relação entre mastites e alterações no cloro, lactose e caseína no leite e comprovaram que em quartos com mastite, a quantidade de caseína estava diminuída, quando comparada com quartos saudáveis. Em 1999, Urech *et al.* investigaram as mudanças na concentração dos nutrientes que constituem o leite durante a ordenha e entre ordenhas. Além das mudanças que ocorrem na caseína e na atividade da plasmina no úbere, há hidrólise das proteínas no leite e aumento na proporção de beta caseína produzida na hidrólise, em vacas com mastite subclínica.

3.7 Sólidos totais do leite

O leite é uma combinação de água (88%) e diversos elementos sólidos que representam aproximadamente 12% de sólidos totais (PALES *et al.*, 2005). Para Noro & González (2001), esses valores podem variar de 12 a 14% para sólidos e 86 a 88% para a água. Os sólidos totais do leite englobam todos os componentes do leite com exceção da água, ou seja, lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas (BRITO *et al.*, 2003), os quais são divididos em dois grupos, os lipídios e os sólidos não gordurosos (VENTURINI *et al.*, 2007). De acordo com Brito *et al.* (2003), os sólidos totais do leite são compostos por concentrações de 4,7 a 5,2% de lactose, 3 a 4% de proteína, 3,5 a 5,3% de gordura, além de sais minerais como cálcio e fósforo, vitaminas do complexo B, vitamina A, D, E e K. Noro & González (2001) afirmam que os níveis de sólidos totais, nas condições brasileiras, variam de 4,6 a 5,2% para a lactose, 3,2 a 3,5% para proteínas, 3,5 a 4,5% para a gordura, 0,7 a 0,8% para minerais. Esses valores são semelhantes aos índices americanos (JACOBSON, 1992). A IN51 do MAPA

(BRASIL, 2002) estabelece para leite tipo A um mínimo de 3% de gordura, extrato seco desengordurado de 8,4% e proteína total 2,9%.

Gomes *et al.* (2006) avaliaram a composição química do leite mediante a presença de diferentes escores de *California Mastitis Test* (CMT) e demonstraram queda no escore de sólidos totais com média de 10,32 a 11,35%. No entanto, esses valores são atribuídos à baixa concentração de gordura no leite dos animais (1,29 a 2,42%) em decorrência da dieta e à reatividade do CMT. De acordo com Pales *et al.* (2005), úberes com mastite diminuem a concentração de nutrientes do leite como a proteína, lactose e gordura, além dos principais componentes minerais e das enzimas também sofrerem variações.

Em outro estudo, Campos *et al.* (2006) avaliaram a composição do leite com a quantidade de CCS em diferentes períodos da primeira fase da lactação e constataram queda nos índices de sólidos totais (11,47%) em função dos baixos valores de lactose (4,56%) e não ao escore de CCS. Por outro lado Bueno *et al.* (2005) observaram queda significativa nos teores de sólidos totais (atribuída a diminuição nos teores de proteína e lactose) conforme o aumento no índice de CCS. Segundo Rubez (2004), o Brasil tem possibilidade de entrar na era do pagamento do leite por sólidos totais e se tornar um grande exportador a exemplo de países como Nova Zelândia e Austrália que possuem índices de sólidos totais em torno de 15%, com favorecido rendimento industrial de produtos lácteos.

Práticas de manejo como limpeza do local de ordenha, higiene do ordenhador, utilização de água potável, uso de solução desinfetante nos tetos antes e depois da ordenha, secagem do teto com papel toalha, higiene dos utensílios e equipamentos, manutenção dos equipamentos e temperatura adequada dos refrigeradores (4°C) auxiliam no controle da mastite e diminuem as perdas nos componentes do leite, bem como mantêm os sólidos totais em níveis adequados (DÜRR, 2005; CANI & FRANGILO, 2008). Wattiaux (1996) relaciona ainda o tratamento adequado de todos os casos clínicos, descarte de vacas cronicamente infectadas, boa nutrição, manejo na sala de ordenha e alimentação das vacas após a ordenha (obrigando-as a manter a estação para fechamento total do canal do teto) como medidas úteis.

Por outro lado, Oliveira & Timm (2006), em estudo com amostras de leite instável à caseína na prova do etanol a 70%, não encontraram diferença significativa nos teores de sólidos totais devido ao mecanismo de compensação no aumento da gordura frente à queda dos níveis de lactose.

3.8 Aspectos hematológicos dos bovinos

O sangue é composto por uma porção celular e outra porção líquida. A porção celular é constituída por eritrócitos, leucócitos e plaquetas e a fração líquida, plasma sanguíneo e solutos. Estes são formados por proteínas plasmáticas, moléculas orgânicas pequenas e compostos inorgânicos (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). Em condições normais, dentre os eritróides, somente os eritrócitos são encontrados no sangue de bovinos. Os eritrócitos têm a função de transportar oxigênio, dióxido de carbono e íons de hidrogênio para os diferentes órgãos e tecidos do organismo (JAIN, 1993; HARVEY 1997).

3.9 Hemograma

Várias técnicas podem ser utilizadas para determinar os valores hematológicos para o hemograma, tanto manuais, quanto por sistemas automatizados. O hemograma fornece principalmente hematócrito, contagem leucocitária total e diferencial, morfologia eritrocitária e concentração plaquetária (LASSEN & WEISER, 2007). O hematócrito (Ht) ou volume globular é a porcentagem do sangue total (células) composta por eritrócitos (HARVEY, 1997). Jain (1993), Kaneko (1997) e Radostits (2000) afirmam que os valores de referência para a espécie bovina no volume globular variam de 24 a 46%, com média de 35%.

O leucograma determina alterações quantitativas e morfológicas das células leucocitárias e é composto pela contagem total de leucócito e contagem diferencial de células (LOPES *et al.*, 2008). Neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos maduros e imaturos constituem os leucócitos encontrados no sangue de bovinos. Cada tipo celular exerce papel importante no sistema de defesa do organismo (JAIN, 1993; LASSEN & WEISER, 2007), já que possuem capacidade de migrar para os locais de inflamação e espaço perivascular, no intuito de destruir e fagocitar células indesejáveis (RINGLER, 1997). O exame diferencial dos leucócitos é realizado no esfregaço sanguíneo corado panópticamente, onde se conta um total de 100 células e se determina os referidos valores através de objetiva de imersão em óleo (STÖBER & GRÜNDER,

1993). Segundo Jain (1993) e Radostits (2000), os valores normais para as células sanguíneas equivalem a monócitos (25 – 840/ μ L), linfócitos (2500 - 7500/ μ L), eosinófilos (0 – 2400/ μ L), neutrófilos (600 - 4000/ μ L) e basófilos (0 - 200/ μ L). Para bovinos, utiliza-se a proporção de 0,5 neutrófilos para cada linfócito e a resposta neutrofilica é a mais fraca do que em qualquer outra espécie doméstica comum (JAIN, 1993; KRAMER, 2000; LOPES *et al.* 2008).

A leucopenia é uma queda no número de leucócitos a índices inferiores a 5.000 cel/mm³ de sangue (STÖBER & GRÜNDER, 1993, TAYLOR, 2000) que geralmente é ocasionada por neutropenia e linfopenia. Normalmente a neutropenia ocorre em infecções bacterianas, enquanto a linfopenia é mais comum em infecções virais (JAIN, 1993). De acordo com Andresen (1970), leucopenia geralmente está associada a doenças do sistema digestório e reprodutivo e, infecções da glândula mamária, com valores inferiores a 5.000 cel/ μ L. Segundo Stöber & Gründer (1993), a leucocitose é uma consequência de infecções víricas ou bacterianas agudas, tanto localizadas quanto generalizadas. Estresses podem ocorrer em animais sadios ou doentes e ocasionar leucocitose fisiológica ou patológica (JAIN,1993). Taylor (2000) observou que no hemograma de animais com mastite clínica houve um aumento nos índices leucocitários e de neutrófilos, com um aumento de 31% e 41,5% respectivamente, em comparação com animais sadios.

3.10 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma proteína plasmática importante na inflamação e por ser precursor da fibrina tem fundamental importância na coagulação. Constitui de 3 a 6% do teor de proteína plasmática total e é sintetizado por hepatócitos. Como o fibrinogênio é removido do plasma pelo processo de coagulação, não se encontra fibrinogênio no plasma. Inflamação aguda ou dano tecidual pode elevar os níveis plasmáticos de fibrinogênio, principalmente em bovinos, sendo este um componente significativo do hemograma na espécie (COLVILLE, 2006; THRALL & WEISER, 2007). A concentração plasmática de fibrinogênio pode ser determinada por dois métodos, um avalia a conversão do fibrinogênio em fibrina na presença de trombina. O outro, mais utilizado na rotina, usa precipitação pelo calor, onde se determina a concentração

protéica plasmática por meio de refratometria em um tubo de microhematócrito. Um outro tubo é suspenso em banho-maria a 56°C por cinco minutos e depois, centrifugado para sedimentar o fibrinogênio (THOMAS, 2000). A diferença entre as duas leituras de proteína plasmática é a concentração de fibrinogênio em mg/dL (LASSEN, 2007).

A resposta inflamatória para danos teciduais é um mecanismo fundamental contra processos que agridem a estrutura fisiológica funcional do organismo (KANEKO, 1997). De acordo com Radostits (2000), a resposta de fase aguda é mediada pelas citocinas, em reação do animal a patógenos invasores, danos teciduais, reações imunológicas e processos inflamatórios, os quais aumentarão a síntese de certas proteínas pelo fígado. Segundo Lopes *et al.* (2008), a resposta do fibrinogênio se inicia junto com a dos leucócitos. Em pacientes com doenças de caráter inflamatório, o fígado é estimulado a produzir proteínas, dentre elas fibrinogênio (globulina), amilóide sérica-A, proteína - C reativa e haptoglobina, além de outras (RINGLER, 1997). Especificamente em bovinos, as duas proteínas de fase aguda principais são amilóide-A sérica e a haptoglobina (KANEKO, 1997, KRAMER, 2000).

O fibrinogênio é descrito por Lopes *et al.* (2008) como uma proteína de fase aguda, que em processos inflamatórios, se eleva entre 3 – 4 dias e se mantém elevada por dias ou mesmo semanas, dependendo da cronicidade da enfermidade. A resposta do organismo através da elevação dos índices de fibrinogênio perante a presença de condições desfavoráveis à glândula mamária foi observado por Tabrizi *et al.* (2008) em vacas com mastite subclínica e clínica comparadas com vacas saudáveis. Kaneko (1997), Kramer (2000), Radostits (2000) e Jain (1993) consideram valores entre 200 – 700 mg/dL normais para a espécie bovina.

3.11 Células de defesa do organismo

3.11.1 Basófilos

Os basófilos são produzidos na medula óssea. Seus grânulos são ricos em substâncias vasoativas (histamina, heparina e serotonina) que, quando estimulados antigenicamente, sintetizam fator ativador plaquetário (FAP), substância de reação à

anafilaxia (SRA) e tromboxano A₂ (TxA₂) (LOPES *et al.*, 2008). Morfologicamente, os basófilos apresentam uma membrana citoplasmática com receptores com alta afinidade para IgE. Essas células atuam em reações de hipersensibilidade do tipo I (imediate) e liberam seu conteúdo granular para o meio extracelular para a eliminação de parasitos (RINGLER, 1997; TIZARD, 1998).

Basófilos contêm enzimas hidrolíticas e antibacterianas que fagocitam material estranho e células (PRESTES *et al.*, 2002). Geralmente, não são encontrados em tecidos extravasculares; no entanto, sob influência dos linfócitos, alcançam os tecidos e provocam processo inflamatório mediado pela serotonina e histamina presente em seus grânulos (TIZARD, 1998). Pode haver elevação da produção e dos níveis dessas células nos animais com mastite. Os valores de referência para a contagem diferencial de basófilos presentes na corrente sanguínea de bovinos são 0 – 200 células/ μ L (KRAMER, 2000; RADOSTITS, 2000; WEISER & THRALL, 2006; THRALL & WEISER, 2007).

3.11.2 Eosinófilos

Em grande parte, os eosinófilos são produzidos na medula óssea, mas outros órgãos como baço, timo e linfonodos cervicais também podem produzi-los, ainda que em menores quantidades (LOPES *et al.*, 2008). Em bovinos, os eosinófilos apresentam o núcleo segmentado e grânulos arredondados ou ovóides e uniformes (RINGLER, 1997; WEISER & THRALL, 2006); no entanto, sua cromatina não se apresenta tão condensada (THRALL & WEISER, 2007).

Os eosinófilos apresentam dois tipos de grânulos em sua estrutura, os primários e os cristalóides (TIZARD, 1998). Os primários contêm enzimas como a peroxidase, nos grânulos cristalóides, a proteína principal básica (MBP) é a predominante. Esta proteína é tóxica para helmintos e protozoários (RINGLES, 1997; TIZARD, 1998). Além dessas, há ainda a proteína catiônica dos eosinófilos (ECP), peroxidase dos eosinófilos (EPO) e a neurotoxina derivada dos neutrófilos (TIZARD, 1998). Os eosinófilos também têm histaminases, quinases, arilsulfatase e a lisofosfolipase, enzimas de caráter antiinflamatório (RINGLER, 1997).

Embora a função dos eosinófilos não esteja claramente identificada, para Weiser & Thrall (2006), essas células apresentam proteínas que se ligam nas membranas de larvas de parasitas, danificando-as, além de atuarem na modulação de reações alérgicas e que envolvam imunocomplexos. Para Radostits (2000), a quantidade de eosinófilos no sangue bovino (0 – 2400/ μ L) equivale aos valores descritos por Jain (1993), Thrall & Weiser (2007) e Weiser & Thrall (2006), assumindo os valores mais elevados dentre as espécies de animais domésticos.

3.11.3 Linfócitos

Os linfócitos são as únicas células que podem reconhecer de uma maneira específica os antígenos (TIZARD, 1998). Desta maneira, determina a base no desencadeamento e execução da resposta imune (LOPES *et al.*, 2008). Os linfócitos apresentam o núcleo grande e arredondado, citoplasma escasso (RINGLER, 1997; TIZARD, 1998) que ocasionalmente pode apresentar grânulos azurofilicos (JAIN, 1993). Linfócitos podem apresentar diferentes formas e tamanho, os pequenos apresentam um diâmetro entre 7 e 9 μ m, com núcleo ligeiramente recortado, arredondado ou oval. Os médios a grandes se destacam por possuir diâmetro entre 9 e 11 μ m, com citoplasma mais profuso e podem apresentar grânulos roxo-rosados. Além disso, pode-se diferenciar os linfócitos pelas imunoglobulinas e marcadores de superfície (JAIN, 1993; TIZARD, 1998; WEISER & THRALL, 2006; THRALL & WEISER, 2007). Linfócitos grandes são frequentemente encontrados em bovinos (JAIN, 1993); entretanto, podem ser de difícil identificação, uma vez que apresentam anéis nucleolares facilmente confundidos com células linfóides neoplásicas (THRALL & WEISER, 2007).

Os linfócitos sanguíneos apresentam subpopulações (WEISER & THRALL, 2006) que podem ser divididas em três grupos celulares, Linfócitos B, Linfócitos T e células NK (*natural killers*) (TIZARD, 1998). Os linfócitos B são produzidos principalmente na medula óssea (STEFFENS III, 2000), mas podem ter produção em menor escala no timo, linfonodos, baço, placas de Peyer e tonsilas (JAIN, 1993). A maturação dos linfócitos B ocorre na própria medula óssea. Exceção ocorre nas aves, nas quais a maturação se dá na Bursa de Fabricius (JONES, *et al.*, 1997; TIZARD,

1998) o que gerou sua denominação de linfócitos Bursa-dependentes ou linfócitos B. As células B reconhecem os antígenos virais através de receptores inseridos na membrana e denominados de BCRs (*B cell receptors*) e que são moléculas de imunoglobulinas da classe IgD e IgM (KREUTZ, 2007). Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral e reconhecem o antígeno através das imunoglobulinas presentes em sua superfície (WEISER & THRALL, 2007).

Já as células T, são produzidas na medula óssea, e ao contrário das células B, têm sua maturação no Timo, o que denomina este tipo de células como linfócitos timo-dependentes ou linfócito T (PASTORET *et al.*, 1998; TIZARD, 1998; DAY, 2000).

Os linfócitos T podem ser divididos em três outros grupos, linfócitos Th (*helper*), linfócitos Tc (citotóxicos) e linfócitos Ts (supressores) (JAIN, 1993; RINGLER, 1997; TIZARD, 1998; KREUTZ, 2007). Linfócitos reconhecem antígenos virais através de receptores de membrana denominados de TCRs (*T cell receptors*) (KREUTZ, 2007). As células T são responsáveis pela regulação imune, imunidade celular e humoral, atividade citotóxica e resposta às citocinas, (JAIN, 1993; WEISER & THRALL, 2006; LOPES *et al.* 2008).

A quantidade de linfócitos encontrados no leite de bovinos varia entre 1 e 2% da população celular (POLITIS *et al.*, 1991). No entanto, Ishikawa & Shimizu (1983) constataram decréscimo na quantidade de linfócitos B no sangue e no leite de animais com mastite. Para Bittar *et al.* (2004), o perfil fenotípico do sangue pode determinar o grau de imunidade. Além dos linfócitos B e T, o organismo apresenta um terceiro tipo celular, denominado de natural *killers* (NK). Estas células se caracterizam por não apresentarem receptores TCR ou BCR (JONES *et al.*, 1997; TIZARD, 1998). Para Jain (1993), as células NK apresentam diferenças quanto à origem, fenótipo, morfologia e célula alvo específica; no entanto, apresentam receptores (receptores Fc) para IgG que as ligam ao anticorpo. Por possuírem um caráter citotóxico, podem ser ativadas por linfocinas como IL – 2. Em vacas, os valores normais de linfócitos se encontram entre 2.500 a 7.500 células/ μL (JAIN, 1993; KRAMER, 2000; RADOSTITS, 2000; WEISER & THRALL, 2006).

3.11.4 Monócitos

Monócitos e neutrófilos são células originadas a partir de uma célula progenitora bipotencial, a UFC-GM que se origina de células tronco pluripotenciais (PPSC). A transformação ocorre através da hematopoiese na medula óssea e por ação de citocinas (BIENZLE, 2000). De acordo com Jain (1993) e Tizard (1998), os monócitos têm formas variáveis, mais comumente a forma de um feijão, com uma cromatina difusa, citoplasma cinza-azulada que pode apresentar vacúolos e/ou pequenos grânulos rosados. Para Weiser & Thrall (2006), os monócitos podem ter forma ovalada, reniforme e segmentada, cromatina menos densa, maior diâmetro e citoplasma mais acinzentado que os neutrófilos.

Na superfície de membrana, os monócitos de bovinos apresentam receptores para IgG (facilita a opsonização) e C3 (proteína), mas não apresentam receptores de membrana para IgM (indução de aglutinação e neutralização de antígenos) como em outras espécies (TIZARD, 1998; BIENZLE, 2000). Os monócitos migram para os tecidos onde se desenvolvem até se transformarem em macrófagos, além disso, apresentam antígeno processado aos linfócitos T (função imunorreguladora) e são responsáveis pela destruição fisiológica de hemácias com reciclagem metabólica de ferro, além de alguns casos de hemólise patológica (WEISER & THRALL, 2006). Há variações quanto à quantidade normal de monócitos na corrente sanguínea dos bovinos, para Weiser & Thrall (2006) os valores estão entre 0 – 800 células/ μL , mas Jain (1993), Kramer (2000) e Radostits (2000) consideram normais os níveis compreendidos entre 25 a 840 células/ μL .

Nickerson & Heald (1982), avaliando a presença de células sanguíneas no parênquima secretor da glândula mamária em vacas infectadas com *Staphylococcus aureus*, constataram um aumento no número de monócitos nos quartos mamários infectados em comparação com os sadios. Além disso, observaram uma prevalência maior de células 10 dias após a infecção. Prin-Mathieu, *et al.* (2002) observaram um decréscimo no número absoluto de monócitos entre 4 e 12 horas após a infusão intramamária de lipopolisacarídeo com intuito de provocar mastite, porém os valores estiveram altos 316 horas após a infusão.

3.11.5 Neutrófilos

Na medula óssea, a partir de uma célula tronco pluripotencial, ocorre a formação de células progenitoras confinadas denominadas de Unidade Formadora de Colônia Granulocítica – Monocítica (UFC–GM). Subseqüentemente, essas células são diferenciadas em células unipotenciais (UFC–G e UFC–M) (SMITH, 2000), as quais se diferenciam e maturam até a formação dos neutrófilos (LOPES *et al.*, 2008). De acordo com Pastoret *et al.* (1998) e Smith (2000), neutrófilos e macrófagos são os maiores fagócitos em bovinos e atuam como a primeira linha de defesa contra infecções, especialmente as causadas por bactérias. Além da formação de neutrófilos, as células unipotenciais são capazes de aumentar indiretamente os efeitos das células mediadoras de imunidade e imunidade humoral, através do aumento da regulação de citocinas como a IL-2 (STABEL, 1991). Para Sordillo *et al.* (1991), células com maior afinidade à IL-2 apresentam tendência maior na sua atividade antibacteriana do que as células que possuem menor exposição à determinada citocina. O mesmo autor demonstrou aumento na eliminação de *Staphylococcus aureus* em decorrência da ativação dos linfócitos pela IL-2.

Morfológicamente, os neutrófilos apresentam núcleo irregular e alongado no formato de um grão de feijão, os quais, à medida que amadurecem, assumem a forma de uma ferradura, com extremidades arredondadas, característica de neutrófilos bastonetes (WEISER & THRALL, 2006). Em bovinos, o citoplasma se apresenta rosa escuro, mas em neutrófilos tóxicos, o citoplasma possui coloração azulada e pode apresentar pequenos grânulos cinza-azulados e angulares (corpúsculos de Döhle), além de vacúolos e tamanho aumentado (THRALL & WEISER, 2007). Os neutrófilos apresentam dois tipos de grânulos citoplasmáticos, os azurofílicos (primários) que apresentam mieloperoxidases e são maiores e mais densos que os grânulos específicos (secundários) (RINGLER, 1997; TIZARD, 1998). Em neutrófilos maduros, a relação normal de grânulos primários para os secundários é de 1:2 (JAIN, 1993).

Os neutrófilos atuam em processos inflamatórios por quimiotaxia positiva ao tecido lesado e fagocitose de microorganismos e materiais estranhos (LOPES *et al.* 2008). Além disso, podem causar danos nos tecidos e ter ação citotóxica como atividades parasiticidas e neoplásicas (RINGLER, 1997; SMITH, 2000). A migração de neutrófilos para os locais onde se encontram os processos inflamatórios é o passo inicial

da resposta inflamatória (VAN OOSTVELDT *et al.*, 2002). Mehrzad *et al.* (2004) observaram um aumento na quantidade de neutrófilos entre 6 a 12 horas após a inoculação intramamária com cepas de *E. coli*, ocasionando um quadro de mastite clínica e conseqüentemente elevado número de células somáticas.

Fox & MacDonald (1988) não constataram aumento na função fagocítica dos neutrófilos em tetos infectados com *S. aureus*, em comparação com os neutrófilos de tetos de animais sadios; no entanto, neutrófilos com suas funções prejudicadas podem contribuir para o desenvolvimento de infecções crônicas causadas pelo mesmo agente. Em bovinos com o propósito voltado para a produção de leite, a presença acentuada de neutrófilos no úbere é característica de animais com mastite subclínica ou com a forma clínica da doença (BOUTET *et al.*, 2004).

De acordo com Pyörala (2003), um processo infamatório iniciado por uma resposta a patógenos causadores de mastite provoca um aumento da infusão intramamária de neutrófilos provenientes do sangue, com conseqüente aumento no escore de células somáticas. A faixa etária pode responder por uma variação de células neutrofílicas. Estudo realizado por Costa *et al.*, (2000) em zebuínos constatou nos animais com até três meses de idade a maior média ($3918/\text{mm}^3$), com declínio desses valores, dos 6 aos 12 meses de idade ($2416/\text{mm}^3$), fato também comprovado por Peixoto *et al.*, (2002), em animais da raça Holandês. De acordo com Jain (1993), Kramer (2000) e Lopes *et al.*, (2008), nas primeiras semanas de vida os neutrófilos são as células predominantes nos bovinos. Após estas semanas e na fase adulta, os linfócitos passam a ser as células predominantes, em uma relação de 0,5 neutrófilo para cada linfócito. Tal relação pode ser alterada em decorrência de uma diminuição dos linfócitos (linfopenia) por infecções sistêmicas agudas, infecção bacteriana severa, inflamação crônica e neoplasias, ou ainda aumento dos neutrófilos (neutrofilia) por infecções locais ou sistêmicas por agentes bacterianos, virais, fúngicos, parasitas ou tumores (SMITH, 2000; LOPES *et al.*, 2008).

Lehtolainen *et al.* (2003) estudaram o efeito de infusões intramamárias de endotoxinas de *E. coli* em vacas no início e no final de lactação e constataram uma neutrofilia associada com linfopenia nas vacas em início de lactação até 32 horas após a inoculação. Neutropenia transitória foi observada de 84 a 168 horas após a inoculação de *M. bovis*, no entanto a linfopenia circulatória permaneceu de 84 horas após a infecção até o final do estudo (KAUF, *et al.*, 2007). Os valores de referência para os neutrófilos segmentados em bovinos estão compreendido entre 600 a 4.000 células/ μL ,

e entre 0 e 120 células/ μ L para neutrófilos bastonetes (JAIN, 1993; KRAMER, 2000; RADOSTITS, 2000; WEISER & THRALL, 2006).

3.12 Haptoglobina (Hp)

A primeira resposta do organismo para estresse imunológico é inata, resposta não específica que precede a resposta imune específica. A resposta de fase aguda (RFA) é uma importante reação sistêmica do organismo para o local de dano tecidual, trauma, ou desordem imunológica (GRUYS *et al.*, 2005; GANHEIM *et al.*, 2007). Durante a RFA, ocorre liberação de citocinas que são mediadores da variação de proteínas de fase aguda (SUBIELA *et al.*, 2001). As citocinas são polipeptídios que atuam localmente para complementar a resposta dos leucócitos ou induzir uma resposta febril (KANEKO, 1997). Quando ocorre um dano tecidual, o organismo intervém para reparar esse dano.

Sob influência das citocinas IL-1, IL-6 e FNT- α , as células hepáticas aumentam a síntese e a secreção de proteínas (TIZARD, 1998; GRUYS *et al.*, 2005). A resposta acontece logo após a lesão, declinando dentro de um ou dois dias. Proteínas cuja concentração se eleva rapidamente nesses casos são denominadas de proteínas de fase aguda (PFA) (RADOSTITS, 2000). O fígado é estimulado a produzir um número de proteínas que podem ser detectadas em níveis mais elevados em pacientes com processos inflamatórios instalados (RINGLE, 1997). As proteínas de fase aguda podem ser divididas em dois grupos: negativas e positivas. As negativas são as que diminuem a concentração quando ocorre a resposta de fase aguda; enquanto que as positivas têm seu nível elevado quando há resposta de fase aguda. Estas podem ser divididas em três grupos adicionais: (a) com aumento de cerca de 50%; (b) com aumento de duas a três vezes sua concentração normal e (c) as cuja concentração aumenta rapidamente em até 1000 vezes (SUBIELA *et al.*, 2001).

Para Kaneko *et al.* (1997), em ruminantes a haptoglobina (Hp) é a proteína de fase aguda mais importante. De acordo com Jain (1993), haptoglobina é uma glicoproteína sintetizada no fígado, com quatro cadeias de polipeptídios e com meia-vida no plasma de dois a quatro dias. Estruturalmente, a haptoglobina é formada por duas subunidades alfa combinadas com duas subunidades betas que se estabiliza ao se juntar com a hemoglobina (SUBIELA *et al.*, 2001). A concentração de haptoglobina

aumenta em bovinos com doenças inflamatórias como mastites, metrites, piometra, reticulite traumática e infecções bacterianas (JAIN, 1993; THOMAS, 2000).

De acordo com Nakagawa *et al.* (1997), há diferença marcante entre humanos e ruminantes quanto à quantidade de haptoglobina no plasma. Em humanos os níveis estão entre 83 e 267 mg/dL (JAIN, 1993), mas em ruminantes, a haptoglobina não pode ser detectada no plasma de animais sadios (SUBIELA *et al.*, 2001; NIELSEN *et al.* 2004). No entanto Nielsen *et al.* (2004) sugerem que Hp e amilóide A sérica (SAA) não são marcadores específicos de processos inflamatórios decorrentes da mastite, ou seja, ocorre aumento plasmático dessas proteínas em resposta a uma infecção severa ou frente a uma condição inflamatória de diferentes origens. Pedersen *et al.* (2003) observaram a resposta inflamatória em bovinos com mastite causada por *Streptococcus uberis*, onde os sinais clínicos estavam presentes cerca de 4 horas após a inoculação do agente e embora os níveis de haptoglobina sérica não aumentaram em nenhum dos animais estudados, houve um aumento da haptoglobina no leite 10 horas após a inoculação.

Contrariando Pedersen *et al.* (2003), Nielsen *et al.* (2004) encontraram diferença significativa na concentração de Hp no plasma sanguíneo e no leite de vacas sadias, com mastite clínica e com processo inflamatório extra-mamário. A Hp foi maior em animais com mastite clínica. Além disso, uma vaca com endometrite e outra com flegmão interdigital também apresentaram valores elevados de Hp para espécie. Para inflamações mais brandas como casos de mastite subclínica, a comparação com vacas fisiologicamente sadias apresentou uma diferença significativa entre as concentrações de haptoglobina no leite (GRÖNLUND *et al.*, 2005). Já Eckersall *et al.* (2001) encontraram aumento significativo da haptoglobina no plasma de animais com mastite clínica branda (presença de grumos no leite) e animais com mastite clínica moderada (presença de grumos no leite e sinais de inflamação na glândula mamária), demonstrando diferença entre animais sadios e animais doentes; contudo, sem diferença significativa entre os dois grupos de animais com mastite.

Em estudo realizado por Horadagoda *et al.* (1999), determinou-se diferença entre inflamação aguda e crônica, em virtude da haptoglobina que em 76% dos casos agudos e 24 % dos casos crônicos mostrou concentrações elevadas. Para demonstrar a sensibilidade das proteínas de fase aguda frente à variabilidade de lipopolisacarídeos, que juntamente com bactérias são potentes indutores de processos inflamatórios, Jacobsen *et al.* (2004) observaram um significativo aumento na concentração de Hp que

confirmou a sensibilidade da resposta de fase aguda de bovinos, com injeções intravasculares de 10 ng/kg de lipopolisacarídeo.

Entretanto, outros fatores podem alterar os níveis de Hp no sangue. Em vacas primíparas, comparadas com vacas múltíparas, danos mais intensos no aparelho reprodutor (útero, vagina e vulva) podem provocar uma resposta fisiológica mais acentuada elevando a concentração sanguínea de Hp (HUMBLET *et al.*, 2006).

Contudo, amostras coletadas inadequadamente podem ocasionar a diminuição da concentração de Hp em processos inflamatórios e causar erro no diagnóstico. Ametaj (2005) afirma que a haptoglobina se liga à hemoglobina liberada no plasma pelas células vermelhas do sangue em condições hemolíticas. Desta maneira, a coleta adequada do material a ser analisado é imprescindível para a precisão do diagnóstico. Além disso, animais sob tratamento com antibióticos podem ter alterados seus níveis de Hp no sangue. Drillich *et al.* (2007) observaram diminuição na concentração sérica de Hp, em vacas tratadas para metrite com antibiótico e antiinflamatório, embora não possam afirmar que o decréscimo seja uma consequência do tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais e identificação dos grupos

Foram selecionadas vacas de rebanhos localizados no Noroeste do estado do Rio Grande do Sul que fazem parte do sistema de controle de rebanho leiteiro prestado pelo Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo (UPF). No período de fevereiro a outubro de 2008, foram coletadas 150 amostras de leite e de sangue de vacas da raça Holandesa, de diferentes rebanhos, sem distinção de idade, número ou fase da lactação.

O critério de escolha das amostras foi o valor de CCS, não havendo distinção entre pequenas, médias e grandes propriedades, nem de níveis de produção dos animais. As amostras foram separadas em três grupos (Tabela 2), conforme os valores de CCS estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (IN51) do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2002) que determina como aceitável um valor inferior a 600.000 cel/mL. Animais acima destes valores correspondem à mastite subclínica ou clínica, dependendo dos sinais clínicos. Adicionalmente, foi considerada a contagem total de bactérias (CTB), conforme a IN51 do MAPA (Tabela 2).

No grupo 1 (G1), foram incluídas as amostras consideradas de animais sadios, com CCS abaixo de 600.000 cel/mL e CTB < 10 UFC/mL; no grupo dois (G2), aquelas com CCS superior a 600.000 cel/mL e CTB > 1.000 UFC/mL, mas com ausência de sinais clínicos, consideradas amostras de animais com mastite subclínica e no grupo três (G3), amostras de animais com sinais clínicos de mastite (grumos no leite em pelo menos um dos tetos no momento da ordenha), independente dos valores de CCS e CTB.

Tabela 2. Grupos estabelecidos para o experimento de acordo com a CCS e CBT, e a presença de sinais clínicos de mastite.

Grupo	Condição	CCS (10 ³ células/mL)	CTB (10 ³ UFC/mL)
G1	Vacas sadias	< 600 ^c	< 10 ^c
G2	Vacas com mastite subclínica ^a	> 600 ^c	> 1.000 ^d
G3	Vacas com mastite clínica ^b		

^a Sem sinais clínicos. ^b Comprovada por exame clínico. ^c Valores máximos determinados pela IN51 (Brasil, 2002) para leite tipo A. ^d Valores máximos determinados pela IN 51 (Brasil, 2002) para todo tipo de leite. UFC: unidades formadoras de colônias.

4.2 Amostras de leite

As amostras de leite de cada animal foram obtidas na ordenha da manhã, após inspeção geral para descartar animais com processos inflamatórios visíveis decorrentes de outras enfermidades (G1 e G2), salvo mastite clínica (G3). Imediatamente antes da ordenha dos animais selecionados, foram desprezados os primeiros jatos e então, feita a coleta das amostras de leite de todos os tetos do úbere, as quais foram homogeneizadas e armazenadas em recipientes próprios para coleta. O leite para análise de CCS foi armazenado em recipientes com capacidade para 50 mL contendo bronopol (8 mg de 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e 0,30 mg de natamicina) como agente conservante. As amostras para determinação da CBT foram armazenadas em outro frasco de 50 mL contendo três gotas de Azidiol como agente bacteriostático para evitar crescimento de bactérias até o momento da análise. Imediatamente após a coleta, as amostras de leite foram armazenadas em caixas térmicas onde a temperatura foi mantida inferior a 7°C e levadas ao SARLE para análise laboratorial.

No laboratório, as amostras com bronopol foram divididas em duas alíquotas, uma para análise pela técnica do infravermelho para determinação de proteína, lactose, gordura e sólidos totais (Bentley 2000, Bentley Instruments, EUA) e outra para a contagem de células somáticas, mediante citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments, EUA). Nessa análise, com o uso do brometo de etídio, o equipamento marca o DNA nas células somáticas do leite, deixando-as fluorescentes. Essas células emitirão *flash* de luz que irá passar por uma série de filtros ópticos que contarão as

células. As amostras com azidiol foram utilizadas para a contagem total bacteriana mediante citometria de fluxo (Bactocount IBC, Bentley Instruments, EUA).

4.3 Amostras de sangue

Imediatamente após a coleta das amostras de leite, foram obtidos 5 mL de sangue através de punção da veia coccígea, com o auxílio de tubos *vacutainer* contendo anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras de sangue foram acondicionadas em caixas térmicas até o momento da análise no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Passo Fundo. No laboratório, as amostras coaguladas foram descartadas e as demais foram homogeneizadas para a montagem de lâminas para determinação da contagem diferencial de leucócitos. Após a secagem, as lâminas foram coradas com corante de Romanowsky (panótico rápido). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetivas de 40 e 100x. A contagem total de leucócitos foi obtida através do método manual utilizando uma alíquota de 20 μ L de sangue para as diluições e posteriormente analisada em câmara de Neubauer.

Nas amostras de sangue foram determinados o hematócrito, as proteínas totais e o fibrinogênio. Para determinação do hematócrito, foi preenchido 2/3 de um capilar com sangue, vedado e posteriormente centrifugado em centrífuga de microhematócrito (Microhemato, Fanem, Mod. 2410) por 5 minutos a 11.500 rpm. Após a leitura da porcentagem de eritrócitos, foram determinadas as proteínas plasmáticas totais (PPT) através da refratometria. Esse procedimento foi realizado em duplicata, onde um dos capilares era incubado em banho-maria a 56°C por três minutos. Após nova centrifugação, foi realizada a leitura das PPT, para assim, obter o valor de fibrinogênio.

Outra alíquota de sangue foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos para separação do plasma. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em tubos *epENDORF* e congeladas a -20°C até a posterior análise de haptoglobina.

4.4 Determinação da haptoglobina no plasma

Foram determinados os valores de haptoglobina plasmática mediante *kit* reagente que utiliza o método espectrofotométrico da atividade peroxidase da hemoglobina (Phase Haptoglobin, Tridelta, Irlanda) usando leitor de ELISA (Rosys Anthos 2010). Para a determinação dos valores, foram realizadas curvas de calibração conforme indica o fabricante. Para cada uma das amostras analisadas foram adicionadas 100 µL do reagente 1 (dilúente de hemoglobina) em seguida 140 µL do reagente 2 (substrato de cromogênio), imediatamente após o último reagente as amostras foram incubadas por um período de 5 minutos em temperatura ambiente e ao término dos 5 minutos as amostras foram lidas, automaticamente, em leitor de ELISA a 630 nm de absorvância, determinando desta forma os níveis de haptoglobina de cada amostra.

4.5 Análise estatística

Na análise estatística, foram avaliados os resultados entre os três grupos de animais, para determinar diferenças dos valores de CCS, CBT, lactose, proteína, gordura e sólidos totais no leite, bem como de contagem total e diferencial de leucócitos, fibrinogênio, hematócrito e proteínas totais no sangue. A ferramenta estatística utilizada foi o programa SPSS 13.0 *Brief Guide* (2004), utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Teste de correlação de Pearson foi utilizado para observar a relação entre os valores de CCS com outros parâmetros (CBT, fibrinogênio e haptoglobina).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades do leite

A contagem de células somáticas é influenciada por vários fatores, especialmente pela presença de infecções da glândula mamária, ainda assim é um indicador confiável da higiene e integridade do úbere (MULLER, 2002). Nas amostras analisadas (n= 150) foram constatadas diferenças estatísticas significativas quanto à CCS entre os três grupos ($p < 0,005$), como era esperado, uma vez que a composição de cada grupo foi estabelecida conforme os diferentes níveis de células somáticas.

A CCS é um indicador adequado da existência de uma infecção intra-mamária, de forma que quanto maior o valor de CCS, maior é a probabilidade que a vaca esteja com mastite (COENTRAO *et al.*, 2008). Os valores encontrados para os três grupos (Tabela 3) demonstram que a média de CCS das amostras do G1 (130×10^3 células/mL) estaria dentro dos parâmetros estabelecidos pela IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002) para o leite tipo A; portanto, leite com excelente qualidade físico-química, enquanto que as médias das amostras do G2 (1.073×10^3 células/mL) e do G3 (4.350×10^3 células/mL), encontram-se fora das condições mínimas estabelecidas, além de serem associadas com perdas de produção da ordem de 20 e 40, respectivamente (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

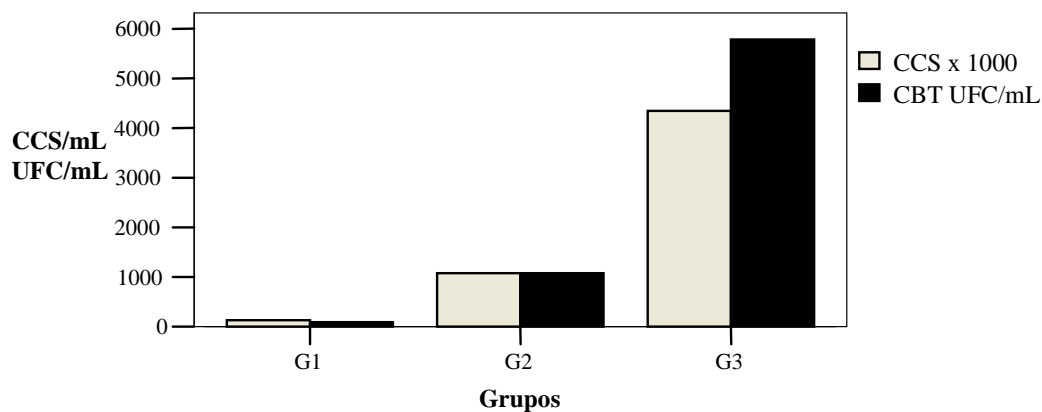
Tabela 3: Média e desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) obtidas das amostras de leite de vacas da raça Holandesa no noroeste do Rio Grande do Sul.

Grupos	N	CCS ($\times 10^3$ células/mL)		CBT ($\times 10^3$ UFC/mL)	
		Média	DP	Média	DP
G1	50	130,42 ^a	58,93	90,44 ^a	62,55
G2	50	1.073,64 ^b	322,10	1.077,48 ^b	1073,60
G3	50	4.349,9 ^c	1.621,72	5.782,72 ^c	2686,13

Letras diferentes indicam médias que diferem entre si no teste de Tukey a 5%. DP= desvio padrão. CCS= contagem de células somáticas. UFC= unidades formadoras de colônia.

O G2 apresentou nível de CCS característico de animais com mastite subclínica, com concentração elevada, sem a presença de sinais clínicos, com alterações apenas nos componentes do leite e que pode evoluir para quadro de mastite clínica (BARBOSA, *et al.*, 2002; GRÖNLUND *et al.* 2005; TOZZETTI *et al.*, 2008). No G3, observaram-se valores significativamente elevados ($p < 0,005$) em comparação aos demais grupos, concomitantemente com a presença dos sinais clínicos observados no leite no momento da coleta da amostra, confirmando a presença de infecção na glândula mamária. Os valores de CCS neste grupo são semelhantes aos encontrados por Whist *et al.* (2007) e Petzl *et al.* (2008) para vacas com mastite. Assim como a CCS, a CBT também apresentou diferença significativa entre os três grupos estudados (Tabela 3), de maneira que os grupos com menor CCS também apresentaram menor índice de UFC/mL, (Figura 1) demonstrando a condição sanitária adequada desses animais.

Figura 1: Média de CCS e CBT no leite de vacas da raça Holandesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).



Desta forma, o G1 foi o que teve menor contaminação bacteriana; enquanto G2 e G3 apresentaram índices de contaminação acima dos valores considerados aceitáveis

pela IN 51 (BRASIL, 2002). Não foram determinados os agentes bacterianos específicos, uma vez que a análise teve caráter quantitativo e não qualitativo.

Existe relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e as taxas de infecções intra-mamárias. Santos & Fonseca (2007) afirmam que as mastites podem contribuir de forma significativa para a elevação da CBT do leite, dependendo do tipo de microrganismo causador da infecção, do estágio e severidade da mastite e da porcentagem de animais infectados no rebanho. Nesse sentido e com base nos resultados obtidos, constatou-se que algumas vacas do G2 e do G3 estavam com os úberes infectados e, portanto, sua qualidade higiênico-sanitária se encontra abaixo do recomendado. A presença de altos níveis de bactérias patogênicas dentro da glândula mamária desenvolve uma série de eventos que alterarão a composição físico-química do leite. O aumento das bactérias dentro do úbere causará aumento acentuado na CCS e a composição do leite sofrerá alterações (BUENO *et al.*, 2008). Além da produção total do leite sofrer decréscimo secundário às lesões nas células secretoras ocasionadas pelas bactérias (WATTIAUX, 1996), podendo ocorrer alterações marcantes em alguns dos nutrientes do leite (DÜRR, 2005). Guimarães *et al.* (2006) observaram efeitos negativos das bactérias sobre a qualidade, o sabor e a vida de prateleira de leite com elevada CBT.

Análises não paramétricas revelaram forte correlação entre CCS e CBT ($r=0,852$, $P<0,01$) e demonstraram que há uma associação linear entre as duas variáveis, ou seja, conforme aumenta a quantidade de CBT no leite, aumenta o valor CCS.

Contrariando tais resultados, Lima *et al.* (2006) não encontraram variação bacteriana significativa em diferentes intervalos de CCS e destacaram não haver necessariamente relação entre CCS e CBT no leite.

Além disso, quanto aos constituintes do leite, houve diferença significativa entre os três grupos nos percentuais de lactose (Tabela 4). As amostras com CCS mais elevadas (G3), apresentaram valor inferior de lactose (Figura 2). Os resultados indicam G1 com média superior (4,52%) do que G2 (4,26%) e G3 (3,8%). Entretanto, nenhum dos três grupos teve as médias dentro dos valores 4,6 e 5,2%, considerados referenciais para a raça Holandesa (NORO & GONZÁLEZ, 2001). Neste sentido, apenas os animais do G1 apresentaram teor de lactose mais próximo dos valores de referência.

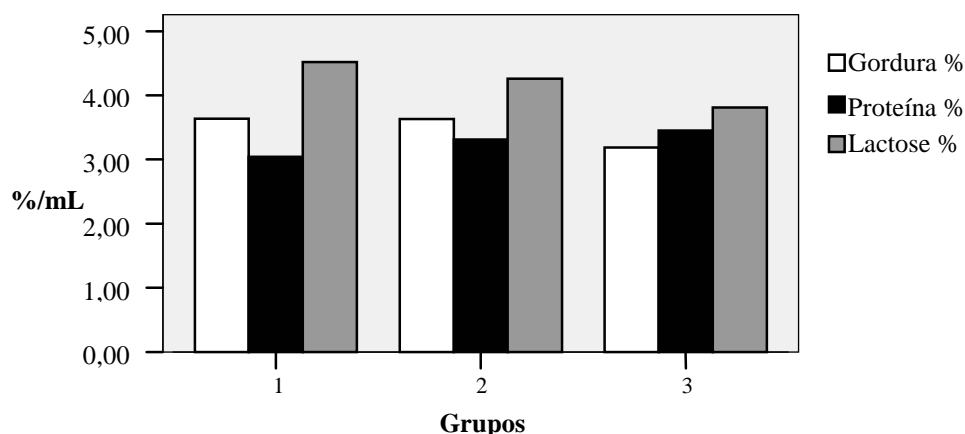
Tabela 4: Média e desvio-padrão de lactose, gordura, proteína e sólidos totais no leite de vacas da raça Holandesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).

Grupo	N	Lactose (%)		Gordura (%)		Proteína (%)		Sólidos totais (%)	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
G1	50	4,52 ^a	0,26	3,64 ^a	0,89	3,04 ^a	0,33	12,11 ^a	0,96
G2	50	4,26 ^b	0,31	3,63 ^a	0,85	3,31 ^b	0,34	12,10 ^a	1,01
G3	50	3,80 ^c	0,56	3,18 ^a	1,44	3,45 ^b	0,53	11,30 ^b	1,75

Letras diferentes indicam médias que diferem entre si no teste de Tukey a 5%. DP= desvio padrão.

Alguns autores acreditam que para ocorrer perdas na produção de leite a CCS não precisa alcançar valores muito elevados. Kirk (1984) demonstrou uma perda na produção na ordem de 0,68 kg/dia a partir de 100×10^3 células/mL, similarmente ao que foi observado por Reneau (1986) que identificou uma queda na produção de leite da ordem de 0,59 kg/dia para vacas multíparas. Contrariando esses autores, Gill *et al.* (1990) acreditam que as perdas começam já com 50×10^3 cél/mL e alcançam de 2,74 a 3,86 kg/dia para valores $CCS \geq 100 \times 10^3$ células/mL. Nossos resultados são semelhantes aos propostos por Prada & Silva (2000), os quais afirmam que, à medida que se acentua o quadro clínico de mastite, o valor de lactose se reduz devido à menor síntese de seus componentes pela destruição do tecido secretor, aumento de permeabilidade da membrana e utilização da lactose por patógenos intra-mamários. Esses fatores podem estar associados com os baixos valores de lactose encontrados, uma vez que a diferença entre a CCS nos três grupos foi significativa.

Figura 2: Média de gordura, proteína e lactose no leite de vacas da raça Holandesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).



Machado *et al.* (2000), Ogola *et al.* (2007) e Bueno *et al.* (2008) constataram um decréscimo significativo nos valores de lactose em amostras de leite com CCS superior a 500.000 cél/mL, confirmando a tese de que animais com mastite subclínica já apresentam quedas relevantes em seus componentes.

Com relação à gordura do leite, percebeu-se que não houve diferenças significativas entre as médias dos três grupos (Tabela 4) compostos por animais sadios, com mastite subclínica e mastite clínica. Embora as médias do G1 (3,63%) e G2 (3,63%) se encontraram dentro dos valores de referência propostos por Brito & Brito (1998), a média do G3 (3,18%) está abaixo dos valores mínimo de referência (Figura 2). Dois fatores principais podem explicar as concentrações de gordura em níveis normais no G1 e G2. O primeiro consiste na alimentação adequada fornecida aos animais, com suplementação de concentrado após as ordenhas e gramíneas à vontade, mantendo uma dieta adequada para animais de criação semi-intensiva. Além disso, à medida que aumenta a contaminação bacteriana, aumentam os danos teciduais e diminui a produção total de leite. Se a proporção de perda na produção acompanha a proporção de gordura produzida, então a concentração de gordura se manterá dentro dos limites normais.

Dados da literatura (PEREIRA *et al.*, 1999; ZAFALON *et al.*, 2007) indicam uma tendência de queda na concentração de gordura conforme os índices de CCS se elevam. A média encontrada para G3 está de acordo com os dados encontrados por Zafalon *et al.* (2007) que mencionaram diminuição na concentração de gordura simultânea com ambos, danos no epitélio secretor e elevação da CCS. Entretanto, os resultados obtidos no G3 são diferentes dos resultados encontrados por Cunha *et al.* (2008) que constataram aumento na porcentagem de gordura em amostras de leite com CCS superior a 3.000.000 cél/mL (3,61%), em comparação com animais com CCS inferior a 100.000 cél/mL (3,46%). Esses autores afirmam que a elevação nos índices de gordura foi ocasionada pela redução na produção de leite conseqüente a danos nas células secretoras.

O valor médio de proteínas do leite do G1 (3,04%) foi significativamente menor ($p < 0,005$) que nos demais grupos analisados (G2: 3,31% e G3: 3,45%) (Figura 2). Isso pode ser justificado pelo aumento de proteína decorrente da presença de células somáticas, como descrito por Gill *et al.* (1990). Pereira *et al.* (1999) encontraram diferenças significativas nas concentrações de proteínas em amostras de leite com e sem mastite. O mesmo autor atribuiu essa elevação ao maior aporte de proteína plasmática para a glândula mamária, com o objetivo de combater o processo inflamatório. Urech

(1998) encontrou resultados semelhantes para a proteína do leite de vacas com mastite subclínica, em decorrência do fornecimento de proteínas do sangue para a glândula mamária. Descreve ainda uma queda na proporção de caseína em consequência dos danos causados por patógenos ao tecido secretor da glândula. Munro *et al.* (1984) atribuem a queda na produção de caseína durante casos de mastite à redução na síntese e ao aumento da degradação em virtude da elevação da atividade das proteinases bacterianas e dos leucócitos.

Cunha *et al.* (2008) mostraram que animais com CCS superior a 3.000.000 cel/mL apresentaram, além do aumento no percentual de gordura, um aumento de 6,2% na porcentagem de proteínas no leite (3,26%) em comparação com animais com CCS inferior a 100.000 cél/mL (3,07%). Em contrapartida, Park *et al.* (2007) encontraram um decréscimo nos níveis de proteína no leite de animais com CCS acima de 351×10^3 cél/mL, atribuída ao aumento da permeabilidade do epitélio mamário associada ao início da inflamação.

Os valores referentes aos sólidos totais não mostraram diferença entre os grupos G1 (12,11%) e G2 (12,10%), com médias dentro dos valores de referência de 12 a 14%, conforme Noro & González (2001). Os resultados do G3 (11,30%) mostram uma concentração média significativamente inferior ($p < 0,005$) aos demais grupos. O reduzido nível de sólidos totais nesse grupo pode ser decorrente de várias causas. Gomes *et al.* (2006) atribuíram queda de sólidos totais devido à baixa concentração de gordura no leite em vacas com mastite, enquanto que Campos *et al.* (2006) relacionam a diminuição de sólidos totais à produção de lactose. Esse argumento também é utilizado por Bueno *et al.* (2005) que citam que a queda na concentração de sólidos totais é consequência da diminuição nos níveis de proteína e lactose do leite. No presente estudo, pode-se atribuir a queda dos níveis de sólidos totais no G3 (vacas com mastite) à redução tanto da lactose, quanto da gordura do leite, provavelmente como consequência de danos teciduais causados por patógenos na glândula mamária.

5.2 Perfil protéico das amostras

As médias das proteínas plasmáticas totais (PPT) não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 5) entre os três grupos analisados. Os resultados se

encontram dentro dos valores de referência (50 e 85 g/L) relatados por Kaneko et al. (1997).

Tabela 5: Média e desvio-padrão dos níveis de proteína plasmática total (PPT) fibrinogênio e haptoglobina (Hp) de vacas da raça Holandesa conforme a CCS.

Grupo	PPT		Fibrinogênio		Haptoglobina	
	(g/L)		(g/L)		(g/L)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
G1	83,7 ^a	6,9	5,16 ^a	2,35	0,41 ^a	0,25
G2	82,6 ^a	6,6	5,48 ^{ab}	2,43	0,41 ^a	0,45
G3	85,9 ^a	7,7	6,50 ^b	2,72	0,70 ^b	0,61

Letras diferentes indicam médias que diferem entre si no teste de Tukey a 5%. DP= desvio padrão.

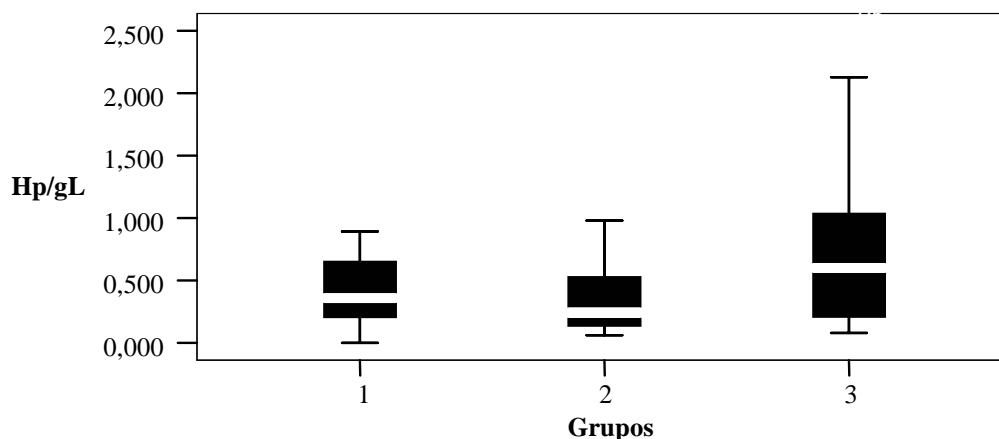
Com relação ao fibrinogênio (Tabela 5), foi verificada diferença estatística significativa entre as médias dos grupos. Em bovinos, o fibrinogênio pode ser utilizado como indicador de uma resposta inflamatória ativa (LOPES *et al.*, 2008). Considerado uma proteína de fase aguda, o fibrinogênio é sintetizado no fígado, sua concentração aumenta em casos de processos inflamatórios decorrentes de causas diversas e pode permanecer elevado por alguns dias (THOMAS, 2000). A média de fibrinogênio no G3 foi significativamente maior quando comparada com o G1 ($p < 0,005$), o que se justifica pela presença da mastite clínica. Entretanto, as médias de fibrinogênio dos três grupos estiveram dentro dos níveis referenciais para bovinos (3 a 7 g/L) preconizados por Jain (1993) e Kaneko *et al.* (1997). Tabrizi *et al.* (2008) constataram uma elevação nos níveis de fibrinogênio no plasma de vacas com mastite subclínica e clínica, quando comparadas com animais sadios, o que demonstra uma resposta do organismo aos danos causados pelas bactérias no úbere.

Algumas proteínas bacterianas se ligam ao fibrinogênio plasmático e convertem o fibrinogênio em fibrina. Por outro lado, a coagulase livre ativa a trombina plasmática e também converte o fibrinogênio em fibrina (GOMES, 2008). Por esse motivo, o valor de fibrinogênio em vacas com mastite clínica pode permanecer dentro dos valores de referência. O fibrinogênio não apresentou sensibilidade para a detecção de mastite subclínica, mas houve elevação dos valores em animais com mastite clínica. Além disso, o fibrinogênio apresentou uma correlação leve, porém significativa ($r = 0,270$, $P < 0,001$) com a CCS.

O principal objetivo desse estudo foi verificar a associação da haptoglobina como marcador para detecção da mastite subclínica em vacas com CCS característico da enfermidade nessa forma de apresentação. Segundo Cho (2002), a haptoglobina é uma proteína de fase aguda presente no sangue dos bovinos que, em animais sadios tem níveis inferiores a 0,05 g/L. Grönlund *et al.* (2005) citam que a produção de proteínas de fase aguda ocorre em consequência de uma resposta aguda, quando o animal apresenta inflamações, infecções, traumas ou estresses. O papel da resposta de fase aguda é o isolamento e neutralização de patógenos causadores de danos teciduais, com o intuito de manter a integridade tecidual e o funcionamento fisiológico normal (KUSHNER, 1982) e a minimização das perdas na produção da glândula mamária em consequência das lesões no epitélio glandular. Após uma injúria tecidual, ocorre a migração de células de defesa para o úbere ou tecido lesado atraídas pelos produtos bacterianos, estimulando a liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e FNT- α) que atuam diretamente no tecido hepático, onde estimulam a secreção de proteínas de fase aguda (TIZARD, 1998; GRUYS *et al.*, 2005). Ohtsuka *et al.* (2001) observaram um aumento nos níveis de citocinas, três dias antes do aumento na concentração de Hp em animais com mastite clínica.

Os resultados obtidos em relação à Hp mostraram que o grupo G3 (0,7 g/L) apresentou média significativamente superior ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (Figura 3).

Figura 3: Média Haptoglobina no plasma de vacas da raça Holandesa sadias (G1), com mastite subclínica (G2) e com mastite clínica (G3).



Este resultado é semelhante ao encontrado por Eckersall *et al.* (2001), os quais observaram uma média de Hp de 0,47 g/L em animais com mastite moderada e CCS média de 6400×10^3 /mL e Hp de 0,74 g/L em vacas com mastite clínica (CCS de 8.700

$\times 10^3$ /mL). Esses autores relataram que vacas controle com CCS média de 560×10^3 /mL apresentaram valores de Hp apenas detectáveis (0,01 – 0,02 g/L). Outros autores também encontraram valores elevados de Hp no soro de vacas com mastite em comparação com animais sadios (CHO, 2002; NIELSEN *et al.*, 2004). Suojala *et al.* (2008) observaram elevação dos níveis de Hp 24 horas após a indução intra-mamária de infecção com bactérias do gênero *E. coli*, com pico atingido entre 60 a 68 horas após a inoculação e declínio por volta do 6º dia.

Contrariando os resultados encontrados por outros, Pedersen *et al.*, (2003) não encontraram aumento na concentração de Hp em animais com mastite induzida 4 horas após a inoculação do agente. Esses achados contestam o fato de que a resposta de fase aguda inicia algumas horas após a lesão. Não foi observada diferença significativa entre os grupos 1 (vacas sadias) e 2 (vacas com mastite subclínica). As médias de Hp nesses grupos se situaram acima do valor de referência para bovinos sadios. Kovac *et al.* (2007) não observou diferença significativa entre as concentrações de Hp no soro de animais com mastite subclínica e vacas sadias. A média de Hp elevada no grupo de vacas sadias com CCS abaixo de 600.000 cel/mL pode ser atribuída à presença de outras enfermidades não detectadas à inspeção geral, principalmente doenças no aparelho reprodutivo. De acordo com Humblet *et al.* (2006), danos no útero, vagina e vulva podem ser mais severos durante o primeiro parto em comparação com vacas multíparas, o que demonstra uma resposta menos intensa para vacas a partir da segunda lactação. Os autores observaram aumento de Hp em vacas primíparas entre 15 e 16 semanas após o parto.

Além desses achados, a presença de infecções uterinas subclínicas pode ter contribuído para o aumento da média de Hp nas vacas do G1. A presença desse tipo de lesão no trato reprodutivo pode dificultar a distinção de uma resposta de fase aguda fisiológica ocasionada pelo parto para uma resposta de fase aguda desencadeada por um processo inflamatório. Os valores de Hp significativamente elevados em animais com mastite (G3) podem indicar severidade da doença, conforme comprovado por Horadagoda *et al.* (1999), Eckersall *et al.* (2001) e Cho (2002), mas não foi possível aplicá-los seguramente para diferenciar animais saudáveis daqueles com mastite subclínica, dentro das condições deste trabalho.

Análises não paramétricas revelaram que há uma correlação significativa entre CCS e Hp ($r= 0,357$, $P< 0,001$). Esses dados demonstram que há uma associação entre a CCS e Hp, o que permite afirmar que o nível de CCS pode ser determinante para o

aumento na concentração de Hp no sangue, especialmente nos animais que apresentam elevada CCS.

5.3 Perfil hematológico das amostras

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de leucócitos totais das vacas analisadas. No entanto, na análise do diferencial das células se percebeu que apenas as médias de monócitos (Tabela 6) apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,005$) entre os grupos. As vacas do Grupo 2 apresentaram média de monócitos superior que as do G1 e G3. Todas as médias estavam dentro dos parâmetros de referência para a espécie no que se relaciona a monócitos (25 – 840/ μL) (KRAMER, 2000).

Tabela 6: Média e desvio-padrão dos níveis do hematócrito, leucócitos totais, monócitos e basófilos de vacas da raça Holandesa conforme a CCS.

Grupo	N	Hematócrito (%)		Leucócitos (/ μL)		Monócitos (/ μL)		Basófilos (/ μL)	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
G1	50	30,6 ^a	3,25	8933,4 ^a	4627,3	246,4 ^a	221,7	234,2 ^a	221,6
G2	50	29,8 ^{ab}	3,38	9023,9 ^a	5557,5	531,4 ^b	615,7	463,7 ^a	780,1
G3	50	28,2 ^b	3,03	7631,9 ^a	5215,2	271,7 ^a	236,1	350,0 ^a	671,8

Letras diferentes indicam médias que diferem entre si no teste de Tukey a 5%. DP= desvio padrão.

A elevação dos níveis de monócitos pode ser causada por infecções crônicas ou inflamações, leucemias e doenças granulomatosas. Casos de monocitopenia, por outro lado, podem ser causados por infecções agudas e inflamações (JAIN, 1993). De acordo com Nickerson & Heald (1982), a elevação no número de monócitos na circulação pode ser indicativo de uma seqüência de eventos, onde há maior produção de células em decorrência do início de um processo inflamatório. Pedersen *et al.* (2004) observaram um decréscimo nos níveis sanguíneos de monócitos e neutrófilos 5 horas após a inoculação intra-mamária de *S. uberis*, o qual voltou ao normal 4 horas após a análise.

Embora os basófilos não tenham apresentado diferença estatística significativa entre os grupos, constatou-se elevação nas médias em comparação aos valores de

referência para bovinos (Tabela 6). Na análise do hematócrito, pode-se observar um valor significativamente menor ($p < 0,05$) no G3 em comparação com os grupos G1 e G2 (Tabela 6). Todos os grupos tiveram a média dentro dos valores de referência para bovinos (24 a 46%), de acordo com Radostits (2000).

6. CONCLUSÕES

A condição sanitária da glândula mamária foi determinante para a redução das concentrações de componentes do leite, sobretudo nas vacas com maior índice de CCS. Essas alterações causam perdas significativas especialmente para o produtor e a indústria leiteira. As vacas com mastite clínica mostraram marcante diminuição dos componentes do leite, especialmente lactose, sugerindo que as lesões causadas no tecido secretor influenciaram negativamente a qualidade do produto final.

Houve forte associação entre a quantidade de bactérias e o valor da CCS no leite, o que sugere que há aumento proporcional entre as duas variáveis.

O leucograma não foi sensível para a detecção da mastite subclínica. Apenas os monócitos estavam alterados, o que é esperado no início de processos inflamatórios.

Houve correlação significativa entre os níveis de fibrinogênio e a CCS, porém sem apresentar sensibilidade para identificar uma condição característica de mastite subclínica.

Os resultados sugerem que, assim como o fibrinogênio, a Hp não foi marcador sensível para detecção de mastite subclínica, quando as médias das vacas desse grupo forem semelhantes às dos animais sadios. No entanto, a CCS e a Hp apresentaram correlação significativa, possivelmente devido à elevada concentração de Hp em animais com sinais clínicos de mastite.

No presente estudo não pode ser comprovado o valor diagnóstico da haptoglobina nos casos de mastite subclínica, contudo se constatou valor na avaliação da severidade de casos de mastite clínica.

BIBLIOGRAFIA CITADA

AMETAJ, B. N. **A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows.** Advances in Dairy Technology (2005) Volume 17, page 97.

ANDRESEN, H. A.; **Evaluation of leukopenia in cattle.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 156 (7):858-867. 1970.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. **Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and significance for mastitis diagnosis.** Journal of Dairy Research, v. 72, p. 144-152, 2005.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S. C.A.; GUIMARÃES, E. C. **Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “Califórnia mastitis test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina.** Biosci J., v. 18, n.1, p. 93-102, june 2002.

BAUMAN, D. E.; MATHER, I. H.; WALL, R. J.; LOCK, A. L. **Major advances associated with the biosynthesis of milk.** J. Dairy Sci. 89:1235 – 1243. 2006.

BIENZLE, D. **Monocytes and Macrophages.** In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm’s Veterinary Hematology.** 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 49, p. 318-325.

BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. **Perfil fenotípico de linfócitos pariféricos de bovinos de raças européias.** Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec. V. 56, n.1, p.107-110, 2004.

BORGES, K. A.; ZANELA, M. B. **Produção de leite e contagem de células somáticas em propriedades da região do vale do Taquari.** 2008. Anais SOVERGS. Disponível em: < <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0092-1.pdf>> Acesso em: 19 set. 2008.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R. BUREAU, F.; LEKEUX, P. **Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis.** J. Dairy Sci. 87:4104-4114. 2004.

BRASIL. 2002. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 51, 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite.** Disponível em: < <http://www.baldebranco.com.br/estatistica.htm>> Acesso em: 17 fev. 2008.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R.; PAIVA E BRITO, M. A.V. **Sensibilidade e especificidade do “califórnia mastitis test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas.** Pesq. Vet. Bras. 17(2):49-53, abr./jun. 1997.

BRITO, M. A. V. P. & BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite**. 1998. Disponível em http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/903.pdf > Acesso em: 23 jun. 2008.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Composição**. EMBRAPA – Agronegócio do leite. 2003. Disponível em < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_2172003924_3.html>. Acesso em: 15 jun. 2008.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. **Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás**. Ciência Rural, Santa Maria, v.35, n.4, p.848 – 854, jul-ago, 2005.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; NEVES, R. B. S.; **Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás**. R. bras. Ci. Vet, v. 15, n. 1, p. 40-44, jan/abr. 2008.

CAMPOS, R.; GONZÁLEZ, F.; COLDEBELLA, A.; CARDOSO, F. **Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção**. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.2, p. 525 – 530, mar-abr, 2006.

CANI, P. C. & FRANGILO, R. F. **Como produzir leite de qualidade**. 2008. Disponível em < <http://www.seag.es.gov.br/wp-content/uploads/2008/05/861.pdf>> Acesso em: 05 dez. 2008.

CHAGUNDA, M. G. G.; FRIGGENS, N. C.; RASMUSSEN, M. D.; LARSEN, T. **A model for detection of individual cow mastitis based on an indicator measured in milk**. J. Dairy Sci. 89:2980-2998, 2006.

CHO, J. G. **Acute phase proteins in dairy cows with mastitis**. Kor. J. Vet. Serv (2002) 25(4): 377 – 384, 2002.

COENTRAO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; PAIVA e BRITO, M. A. V.; LILENBAUM, W. **Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras**. Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec., v.60, n.2, p.283-288, 2008.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; JÚNIOR, P. J. R.; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D. **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**. R. Bras. Zootec., v.33, n.3, p.623-634, 2004.

COLVILLE, J. **Bioquímica sanguínea**. In: HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4ed. São Paulo: Editora Roca, 2006, cap.3, p. 79 – 108

COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; FILHO, I. R. B. **Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça nelore (*bos indicus*)**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n. 3, p.399-403, 2000.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. **Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas em número de lactações, produção e composição química do leite de vacas da raça Holandesa**. Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec., v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DAY, M. J. **Biology of lymphocytes and plasma cells**. In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 40, p. 240-246.

DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHUR, K. F.; SCHINGOETHE, D. J. **Feeding lactose increases ruminal butyrate and plasma β -hydroxybutyrate in lactating dairy cows**. J. Dairy Sci. 87:2486 – 2494. 2004.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAUJO, W. P.; COSTA, E. O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J. F. P.; BENATTI, L. A. T. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas**. Ver. Bras. Saúde Prod. An. 1(2): 42-47, 2001.

DETILLEUX, J.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. **Mathematical model of the acute inflammatory response to *Escherichia coli* in intramammary challenge**. J. Dairy Sci. 89:3455 – 3465, 2006.

DRILLICH, M.; VOIGT, D.; FORDERUNG, D.; HEUWLESER, W. **Treatment of acute puerperal metritis with Flunixin Meglumine in addition to antibiotic treatment**. J. Dairy Sci. 90:3758-3763, 2007.

DÜRR, J. W. **Atualização em pastagem e produção animal – ruminantes**. Curso de extensão. Módulo 11. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo: UPF. 2002.

DÜRR, J. W. **Limites da contaminação bacteriana** In: DÜRR, J. W. **Como produzir leite de alta qualidade**. Serviço nacional de aprendizagem rural. Impresso no Brasil, Brasília, 2005. cap. 5, p. 10.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; McCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S. WEBER, A.; McDONALD, T.; NOLAN, A. M.; FITZPATRICK, J. L. **Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis**. Veterinary record (2001) 148, 35 – 41. 2001.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; NOLAN, A. M.; KNIGHT, C. H.; McCOMB, C.; WATERSTON, M. M.; HOGARTH, C. J.; SCOTT, E. M.; FITZPATRICK, J. L. **Acute phase proteins in bovine milk in a experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis**. J. Dairy Sci. 89: 1488 – 1501. 2006.

FONTANELI, R. S. & GONZÁLEZ, F. H. D. **Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite.** 2001. Disponível em <www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/quimica_leite.pdf> Acesso em: 04 jun. 2008.

FOX, L. K. & McDONALD, J. S. **Functional activity of neutrophils from bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*.** J. Dairy Sci. 71:3521-3524. 1988.

GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K. P. **Acute phase proteins as indicators of calf herd health.** The veterinary Journal 173. 645 – 651. 2007.

GILL, R.; HOWARD, W. H.; LESLIE, K. E.; LISSEMORE, K. **Economics of mastitis control.** J. Dairy Sci. 73:3340-3348. 1990.

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; VIEIRA, M.; PAGOTTO, L. G. **Composição físico-química do leite de vacas holandesas de acordo com a reatividade ao "califórnia mastitis test".** 2006. Disponível em <http://unianhanguera.edu.br/programasinst/Revistas/revistas2006/rev_veterinaria_2/02.pdf> Acesso em: 27 jun. 2008.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Staphylococcus* spp.** 2008. Disponível em <www.ufrgs.br/labacvet/pdf/staphylococcus_2008-2.pdf> Acesso em: 07 dez. 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação.** In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Porto Alegre, 2001. 77p.:il.

GONZÁLEZ, F. H. D & CAMPOS, R. **Indicadores metabólico-nutricionais do leite.** In: GONZÁLEZ, F. H. D & CAMPOS, R. **Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária da região Sul do Brasil.** Porto Alegre – RS. 2003

GONZÁLEZ, F. H. D. & SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica veterinária.** 2ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006, cap. 1, p. 13 – 47.

GRÖNLUND, U.; SANDGREN, C. H.; WALLER, K. P. **Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis.** Vet. Res. 36 (2005) 191 – 198.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. **Acute phase reaction and acute phase proteins.** J zhejiang Univ SCI. 6B(11): 1045 – 1056, 2005.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção.** Ciênc. Agrotec., Lavras, v. 29, n.1, p. 216-222, jan/fev. 2005.

GUIMARÃES, C. P. A.; MESQUITA, A. J.; COELHO, K. O.; MELO, C. S.; ALMEIDA, S. D. S.; XAVIER, E. S. 2006. **Influência da adoção do pagamento por qualidade sobre a contagem bacteriana total do leite cru.** Disponível em < www.terraviva.com.br/IICBQL/p008.pdf> Acesso em: 04 de ago. 2008.

HARVEY, J. W. **The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders.** In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 9th ed. San Diego , California: Academic Press, 1997, cap. 7, p. 157 – 194.

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M. G.; GIBBS, H. A.; REID, S. W. J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E. S.; ECKERSALL, P. D. **Acute phase proteins incattle: discrimination between acute and chronic inflammation.** Veterinary record (1999) 144, 437 - 441. 1999.

HUMBLET, M. F.; GUYOT, H.; BOUDRY, B.; MBADAYAH, F.; HANZEN, C.; ROLLIN, F.; GODEAU, J. M. **Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period.** Veterinary Clinical Pathology. Vol.35 / Nº. 2 / 2006.

ISHIKAWA, H. & SHIMIZU, T. **Depression of β -lymphocytes by mastitis and treatment with levamisole.** J. Dairy Sci. vol. 66, nº.3, 1983.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H.; TOELBOELL, T.; HEEGAARD, P. M. H. **Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response.** J. Dairy Sci. 87:3330 – 3339. 2004.

JACOBSON, R. **Calculating milk equivalents: milkfat or total solids basis.** Dairy markets and policy - issues and options. 1992. Disponível em < <http://www.cpdmp.cornell.edu/CPDMP/Pages/Publications/Pubs/P2.pdf>> Acesso em: 08 jun. 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia, 1993. pp. 417.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, NORVAL, W. **Genital system.** In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, NORVAL, W. **Veterinary pathology.** 6th ed. Baltimore, Maryland, 1997, cap. 25, p. 1149 – 1223.

KANEKO, J. J. **Serum proteins and the dysproteinemias.** In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 9th ed. San Diego , California: Academic Press, 1997, cap. 5, p. 117 – 137

KAUF, A. C. W.; ROSENBUSCH, R. F.; PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D. **Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection.** J. Dairy Sci. 90:3336-3348. 2007.

KIRK, J. H. **Programable calculator 'program for linear somatic cell scores to estimate mastitis yield losses.** J. Dairy. Sci 67:441-443. 1984.

KOVÁČ,G.; POPELKOVÁ, M.; TKÁCIKOVA, L.; BURDOVÁ, O. IHNÁT, O. **Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows.** ACTA VET. BRNO 2007, 76: 51 – 57, 2007.

KRAMER, J. W. **Normal hematology of Cattle, Sheep, and Goats.** In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 166, p. 1075-1084.

KREUTZ, L. C. **Resposta imunológica contra vírus.** FLORES, Eduardo Furtado. **Virologia veterinária.** 1ed. Santa Maria: Ed. da UFSM. 2007. cap. 9, p. 239-258.

KUSHNER, I. **The acute phase response: na overview.** **Methods Enzymol.** 163:373-383. 1982.

LADEIRA, S. R. L. **Mastite bovina.** In: RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos.** 2ed, Pelotas: Varela, 2003. v1, cap. 3, p. 294 – 307.

LASSEN, E. D. **Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo.** In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G.. **Hematologia e bioquímica veterinária.** 1ed. São Paulo: Editora Roca, 2007, cap. 26, p. 376- 390.

LASSEN, E. D.& WEISER, G. **Tecnologia laboratorial em medicina veterinária.** In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** 1ed. São Paulo: Editora Roca. 2007. cap. 1, p. 3 – 36.

LEHTOLAINEN, T.; SUOMINEN, S.; KUTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S. **Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows.** J. Dairy Sci. 86:2327-2333. 2003.

LIMA, M. C. G.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; MENDES, E. S.; ALMEIDA, C.C.; SILVA, R. P. P. E. **Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo c produzido na região agreste do estado de Pernambuco.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.73, n.1, p.89-95, jan/mar., 2006.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Hematologia clínica.** In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008, cap. 1, p. 09 – 46.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. **Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas.** Rev. Bras. Zootec., 29(6): 1883 – 1886, 2000.

MAGALHÃES, H. R.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. **Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa.** R. Bras. Zootec., v.35, n.2, p.415-421, 2006.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. **Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis.** J. Dairy Sci. 87:4150-4162. 2004.

MÜLLER, E. E.; **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite.** Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Toledo – PR, 2002.

MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. **Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products.** Austr. J. Dairy Technol., v.35, p.261-263, 1984.

NAKAGAWA, H.; YAMAMOTO, O.; OIKAWA, S.; HIGUCHI, H.; WATANABE, A.; KATO, N. **Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver.** Research in Veterinary Science 1997, 62, 137 – 141.

NICKERSON, S. C & HEALD, C. W. **Cells in local reaction to experimental *Staphylococcus aureus* infection in bovine mammary gland.** J. Dairy Sci 65:105-116. 1982.

NIELSEN, B. H.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H.; NIEWOLD, T. A.; HEEGAARD, P. M. H. **Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions.** Veterinary Record. 154, 361 – 365. 2004.

NORO, G. & GONZÁLEZ, F. H.D. **Síntese e secreção do leite.** 2001. Disponível em < www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/sintese_leite.pdf > Acesso em: 04 jun. 2008.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. **Effect of mastitis on raw milk compositional quality.** J. Vet. Sci (2007), 8(3), 237 – 242. 2007.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. **Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis.** J. Vet. Med. Sci. 63(6):675-678, 2001.

OLIVEIRA, D. S.; & TIMM, C. D. **Composição do leite com instabilidade da caseína.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(2): 259-263. abr.-jun. 2006.

PALES, A. P.; SANTOS, K. J. G.; FIGUEIRAS, E. A.; MELO, C. S. **A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil.** Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás. ISSN 1808 – 8597, v.1, n. 2, p. 162 – 173, nov. 2005. Disponível em < http://www.fmb.edu.br/revista/volume1_n2_a.php > Acesso em: 27 maio 2008.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; HWANG, S. Y.; JUNG, W. K.; KIM, J. M.; SHIN, S.; KIM, R. T.; PARK, Y. H. **The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea.** J. Dairy Sci. 90:5405-5414. 2007.

PASTORET, P.P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of vertebrate immunology.** 1º ed. Academic Press. Califórnia. San Diego, EUA. 1998.

PEDERSEN, L. H.; AALBAEK, B.; RONTVED, C. M.; INGVARSTEN, K. L.; SORENSEN, N. S.; HEEGAARD, P. M. H.; JENSEN, H. E. **Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis***. J. Comp. Path., Vol. 128, 156 – 164. 2003.

PEIXOTO, A. P. C.; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; SAITO, M. E. **Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca – Influência dos fatores etários**. Ver. Bras. Saúde Prod., Na. 3 (1): 16-20, 2002.

PEREIRA, A. R.; PRADA e SILVA, L. F.; MOLON, L. K.; MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G. **Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína**. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci. vol.36 n.3, 1999.

PERES, J. R. **O leite como ferramenta do monitoramento nutricional**. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Ed. Félix H. D. González et al., Porto Alegre, 2001, p. 29-43.

PERFIELD II, J. W.; LOCK, A. L.; GRINARI, J. M.; SAEBO, A.; DELMONTE, P. DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. **Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows**. J. Dairy Sci. 90:2211 – 2218. 2007

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTER, J.; YANG, W.; SEYFERT, H.; NÜRBERG, G.; SCHUBERTH, H. ***Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cows**. Vet. Res. (2008) 39:18.

PHILPOT, N. & NICKERSON, S. C. **Mastitis: couter attack**. Illinois, Babson Bros. Co. 1880 Country Farm Drive Naperville, 1991, 150p.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSK, T. **Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance**. J. Dairy Sci. 87:2433-2441. 2004

POLITIS, I.; ZHAO, X.; McBRIDE, W. B.; BURTON, J. H. **Effect of bovine skim milk and whey on manocyte function**. J. Dairy Sci 74:2467-2471. 1991.

PRADA e SILVA, L. F.; PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÉS, G. A. **Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais**. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.37, n.4, 2000.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. **Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão**. Revista da FZVA. Uruguaiana, v.9, n. 1, p. 118-132. 2002.

PRIN-MATHIEU, C.; LE ROUX, Y.; FAURE, G. C.; LAURENT, F.; BÉNÉ, M. C.; MOUSSAOUI, F. **Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 2002, p. 812-817.

PYÖRALA, S. **Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis.** Vet. Res. 34:565-578. 2003.

RADOSTITS O.M., BLOOD D.C., GAY C.C.. **Mastitis.** In: **Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** 9th ed. London, Baillière Tindall. 2000. pp.603-700.

RENEAU, J. K. **Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control.** J. Dairy Sci. 69:1708-1720. 1986.

RIBEIRO JÚNIOR, E.; SILVA, M. H.; VIEGAS, S. A.A.; RAMALHO, E.J.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, F. C.S. **Califórnia mastitis test (CMT) e *whiteside* como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica.** Ver.Bras. Saúde prod.Na., v.9,n.4, p. 680-686, out/dez, 2008.

RIGOUT, S.; LEMOSQUET, S.; BACH, A.; BLUM, J. W.; RULQUIM, H. **Duodenal infusion of glucose decreases milk fat production in grass silage-fed dairy cows.** J. Dairy Sci. 85:2541 – 2550. 2002.

RINGLER, D. J. **Inflamation and repair.** In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Veterinary pathology.** 6th ed. Baltimore, Maryland, 1997, cap. 5, p. 113 – 158.

RUBEZ, J. **A era dos sólidos totais.** 2004 Disponível em <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_094.htm> Acesso em: 26 maio 2008.

SANTOS, M. V. & FONSECA, L. F. L. 2007. **Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** 1^o Edição. Editora Manole LTDA.

SHARER, M. V.; SU, C.; HEGDE, N. V.; JAYARAO, B. M.; SORDILLO, L.M. **Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of *Staphylococcus aureus* in milk.** J. Dairy Sci. 86:2373 – 2381. 2003.

SILVA, P. H. F. **Leite: aspectos de composição e propriedades.** Química e sociedade. n.6, Novembro, 1997.

SMITH, S. G. **Neutrophils.** In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 46, p. 281-296.

SORDILLO, L. M.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. **Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2.** J. Dairy Sci. 74:3370-3375. 1991.

STABEL, J. R.; KERHLL, M. E.; JR., JOHN; THURSTON, J. R.; GOFF, J. P.; BOONE, T. C. **Physiology and management.** J. Dairy Sci. 74:3755-3762. 1991

STABENFELDT, G. H. & DAVIDSON, A. P. **Reprodução e lactação: A glândula mamária.** In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária.** 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2004. p. 417 – 431.

STEFFENS III, W. L. **Ultrastructural Features of Leukocytes**. In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 50, p. 326-336.

STÖBER, M. & GRÜNDER, H. D. **Sistema circulatório**. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 1993. cap. 5. p. 99-132.

SUBIELA, S. M.; TECLES, F.; PARRA, M. D.; CERÓN, J. J. **Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas em medicina veterinária**. AN. VET. (MURCIA) 17: 97-114 (2001).

SUOJALA, L.; ORRO, T.; JÄRVINEN, H.; SAATSI, J.; PYÖRÄLÄ, S. **Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows**. Acta Veterinária Scandinavica 2008, 50:18.

TABRIZI, A. D.; BATAVANI, R. A.; REZAEI, S. A.; AHMADI, M. **Fibrinogen and ceruloplasmin in plasma and milk from dairy cows with subclinical and clinical mastitis**. Park. J. Biol. Sci. 2008, feb. 15;11(4):571-6.

TAYLOR, J. A. **Lwukocyte responses in ruminants**. In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 57, p. 391-404.

TÉLLEZ, S. A. & ROMERO, L. **Anatomia y fisiologia de la glândula mamaria**. In: TÉLLEZ, S. A.; CHÁVES, A. G. **Producción de leche em ganado bovino**. cap.6 2006. Disponível em < www.fmvz.unam.mx/bibliwir/BvS1Lb/BvS1Pdf/Avila/index3v.pdf > Acesso em: 03 maio 2008.

THOMAS, J. S. **Overview of Plasma Proteins**. In:FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N, C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 134, p. 891-898.

THRALL, M. A. & WEISER, M. G. **Hematologia das espécies doméstica comuns**. In: THRALL, M. A. & WEISER, M. G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Editora Rocca, 2007. cap. 5-14, Seção 2.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 5^o ed. – São Paulo: Roca, 1998.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura**. Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária – ISSN: 1679-7353. 2008.

URECH, E.; PUHAN, Z. SCHÄLLIBAUM, M. **Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis**. J. Dairy Sci. 82:2402-2411. 1999.

VANLANDINGHAM, A. H.; WEAKLEY, C. E. J.; MOORE, E. N.; HENDERSON, H. O. **Mastitis. I. The relationship of the development of mastitis to changes in the chlorine, lactose and casein number of milk**. J. Dairy Sci. 24: 383-398. 1940.

VAN OOSTVELDT, K.; PAAPE, M. J.; BURVENICH, C. **Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells.** J. Dairy Sci. 85: 139 – 147. 2002.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do leite.** Universidade Federal do Espírito Santo. 2007. Disponível em < http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf > Acesso em: 02 ago. 2008.

XIAO, C. T. & CANT, J. P. **Relationship between glucose transport and metabolism in isolated bovine mammary epithelial cells.** J. Dairy Sci. 88:2794 – 2805. 2005.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. **Comparação entre o *california mastitis test* e a contagem de células somáticas como métodos auxiliares para o diagnóstico da mastite bovina por *Staphylococcus aureus* E *Corynebacterium* SPP.** B. indústr. Anim., N. Odessa, v.62, n.1, p.63-69, 2005.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. **Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo beneficiada antibioticoterapia de vacas em lactação.** Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec., v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZHAO, F. -Q. & KEATING, A. F. **Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland.** J. Dairy Sci. 90(E. Suppl.): E76 – E86. doi: 10.3168/jds.2006 – 740. 2007.

WATTIAUX, M. A. **Mastitis: The disease and its transmission.** Babcock Institute International Dairy Research and Development UW- Madison, Wisconsin. 1996. Disponível em: < <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/23.en.pdf> > Acesso em: 19 abr. 2008.

WATTIAUX, M. A. & ARMENTANO, L. E. **Carbohydrate metabolism in dairy cows.** Babcock Institute International Dairy Research and Development UW- Madison, Wisconsin. 2000. Disponível em: < <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/03.en.pdf> > Acesso em: 19 abr. 2008.

WEISER, M. G. & THRALL, M. A. **Hematologia.** In: HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários.** 4ed. São Paulo: Editora Roca, 2006, cap. 10, p. 118 – 122.

WHIST, A. C.; ØSTERÅS, O.; SØLVERØD, L. ***Streptococcus dysgalactiae* isolates at calving and lactation performance within the same lactation.** J. Dairy Sci. 90:766-778. 2007.

ANEXOS

CCS

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	50	130,42		
2	50		1073,64	
3	50			4349,90
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

CBT

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	50	90,44		
2	50		1077,48	
3	50			5782,72
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Correlations

		CCS	CBT
CCS	Pearson Correlation	1	,852**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	150	150
CBT	Pearson Correlation	,852**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	150	150

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Hematócrito

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	50	28,28	
2	50	29,80	29,80
1	50		30,60
Sig.		,052	,432

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000

PPT

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
2	50	8,262
1	50	8,372
3	50	8,598
Sig.		,051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Fibrinogênio

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	50	516,00	
2	50	548,00	548,00
3	50		650,00
Sig.		,800	,108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Correlations

		CCS	Fibri
CCS	Pearson Correlation	1	,270**
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	150	150
Fibri	Pearson Correlation	,270**	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	150	150

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Leucograma

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
3	50	7631,92
1	50	8933,45
2	50	9023,90
Sig.		,369

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Linfócitos Totais

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
3	50	7368,36
2	50	8834,38
1	50	10558,84
Sig.		,100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Segmentados

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
3	50	2988,20
2	50	3570,90
1	50	3702,12
Sig.		,098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Eosinófilos

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
3	50	518,75
1	50	534,55
2	50	788,52
Sig.		,410

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 46,588.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Basófilos

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
1	50	234,25
3	50	350,00
2	50	463,71
Sig.		,837

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,362.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Linfócitos

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05
		1
3	50	3742,72
2	50	4250,10
1	50	4832,82
Sig.		,315

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 50,000.

Monócitos

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	50	246,44	
3	50	271,78	
2	50		531,44
Sig.		,960	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 37,946.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

CCS

Tukey HSD^{a,b}

V1	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	32	129,69		
2	40		1056,60	
3	34			4663,44
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35,021.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Hp

Tukey HSD

V1	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
2	40	,41880	
1	32	,41941	
3	34		,73738
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 35,021.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Correlations

		CCS	Hp
CCS	Pearson Correlation	1	,357**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	106	106
Hp	Pearson Correlation	,357**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	106	106

** . Correlation is significant at the 0.01 level