

Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas¹

Karina Medici Madureira^{2*}, Viviani Gomes², Roberto Soares de Castro³,
Sandra Satiko Kitamura⁴ e Wanderley Pereira de Araújo⁵

ABSTRACT.- Madureira K.M., Gomes V., Castro R.S., Kitamura S.S. & Araújo W.P. 2010. [Analysis of direct and indirect methods for somatic cell counts in the milk of healthy goats.] Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(4):311-316. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva 87, Bloco 12-14, Sala 47, São Paulo, SP 05508-000, Brasil. E-mail: karinamedici@yahoo.com.br

The particular apocrine secretion of goat milk different from the merocrine one observed in cows, may lead to errors in interpreting cellularity evaluations in the milk of this species. Thus, the objective of the present trial was to determine Somatic Cell Counts by means of one indirect methods, the California Mastitis Test (CMT), and direct methods, flow cytometry and direct microscopic count using methyl green-pyronine-Y stain, beyond comparing the methods of cellular counting. A total of 102 samples from 51 Saanen, Brown Alpine and Toggenburg female goats, bred in the state of São Paulo, were analyzed. Goats were separated in groups according to the phase of lactation and to physical examination of the mammary gland, and milk examination. Samples were divided into two aliquots, and were collected after California Mastitis Test evaluation. One aliquot was used in automatic cell counts, and the other, in direct microscopic count using methyl green-pyronine-Y stain. CMT results were as follows: 74.5% of the samples were negative, 8.8% yielded traces, 8.8% were weak positive (1), 6.8% were distinct positive (2) and 0.9% were strong positive (3). Medians of somatic cell counts in goat milk as evaluated by means automatic cell counter and direct microscopy, and grouped according to the different CMT scores, were as follows: 181,000, 578,000, 628,000, 1,421,500, and 5,542,000 cells/mL of milk and 74,991, 271,396, 71,420, 640,995, and 5,049,394 cells/mL of milk in scores negative, traces, 1, 2 and 3, respectively. Medians obtained in automatic cell counts and direct microscopic counts, grouped according to the phase of lactation were 159,500; 508,000; and 277,500 cells/mL of milk and 62,493; 89,275; and 146,411 cells/ml of milk, respectively. The correlation between the automatic and microscopic methods for somatic cell counts was 88%. Based on the results obtained, it could be concluded that there were differences between the automatic and microscopic methods for somatic cell counts, being this most adequate for the determination of the cellularidade in the cellularity of goat milk.

INDEX TERMS: Flow cytometry, green-pyronine-Y stain, goats.

¹ Recebido em 22 de janeiro de 2009.

Aceito para publicação em 30 de outubro de 2009.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário Anhanguera, Rua Waldemar Silenci 340, Cidade Jardim, Leme, SP 13614-370, Brasil. *Autor para correspondência: karinamedici@yahoo.com.br

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de

Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 92171-900, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Anhembi Morumbi, Rua Dr. Almeida Lima 1134, Centro, São Paulo, SP 03164-000, Brasil.

⁵ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva 87, Bloco 12-14, Sala 47, São Paulo, SP 05508-000.

RESUMO. A particularidade da secreção láctea caprina, do tipo apócrina, diferente da secreção merócrina da vaca, leva a erros de interpretação durante a realização de técnicas de avaliação da celularidade do leite de fêmeas desta espécie. Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de determinar a contagem de células somáticas pelo método indireto California Mastitis Test (CMT), e por métodos diretos, incluindo a contagem por citometria de fluxo e a contagem microscópica direta, através da coloração de verde de metil e pironina-Y, além de comparar os métodos de contagem celular. Foram analisadas 102 amostras de 51 fêmeas caprinas, das raças Saanen, Parda Alpina e Toggenburg, criadas no Estado de São Paulo. Os animais foram categorizados segundo a fase da lactação, exame físico da glândula mamária e exame do leite. As amostras foram colhidas, após a realização do exame Califórnia Mastitis Test, em duas alíquotas, uma destinada à contagem celular automática e a outra, a contagem microscópica direta, utilizando-se o corante verde de metil e pironina-Y. De acordo com os diferentes escores do CMT, observou-se 74,5% de amostras negativas, 8,8% de amostras com escore traços, 8,8% de amostras ligeiramente positivas (+), 6,8% de amostras fracamente positivas (++) e 0,9% de amostras fortemente positivas (+++). Os valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras, avaliadas através de contador automático e microscopia direta, e analisadas de acordo com os diferentes escores do CMT, foram, respectivamente, 181.000, 578.000, 628.000, 1.421.500 e 5.542.000 células/mL de leite e 74.991, 271.396, 71.420, 640.995 e 5.049.394 células/mL de leite, nos escores negativo, traços, +, ++ e +++. Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas pelo método automático e microscópico direto, de acordo com as fases de lactação foram de 159.500, 508.000 e 277.500 células/mL de leite, e 62.493, 89.275 e 146.411. A correlação obtida entre a contagem celular automática e microscópica direta foi de 88%. A partir dos resultados observados pode-se concluir que existe diferença na contagem celular determinada através do método automático e microscópico sendo este último o mais adequado para a determinação da celularidade no leite de cabras.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Citometria de fluxo, coloração de verde de metil e pironina-Y, caprinos.

INTRODUÇÃO

A glândula mamária das cabras é composta por ácinos, constituídos por células epiteliais. Durante a secreção láctea do tipo apócrina, diferente da secreção merócrina da vaca (Dulin et al. 1982, Perrin & Baudry 1993), a porção distal das células epiteliais alveolares separa-se de sua base e é eliminada no lúmen dos ácinos sob a forma de partículas citoplasmáticas, de tamanhos variáveis, normalmente grandes, de 5-30mm, cujas dimensões e morfologia são semelhantes aos leucócitos (Dulin et al. 1983, Perrin & Baudry 1993). Essas partículas são anucleadas em sua maioria (Paape & Capuco 1996), são pre-

enchidas por glóbulos de gordura (Perrin & Baudry 1993), e correspondem a 35% dos elementos celulares observados no leite de cabras (Sierra et al. 1998). Tais partículas estão ausentes no leite de vaca (Park & Humphrey 1986, Perrin & Baudry 1993, Gonzalo 1995), o que aumenta aparentemente a concentração de leucócitos no leite de fêmeas caprinas, quando são utilizados os métodos tradicionais de contagens celulares para o leite de vacas (Dulin et al. 1983, Hinckley 1983, Droke et al. 1993, Silva et al. 1996). Este fato salienta a importância da padronização e adoção de técnicas de contagens celulares específicas para caprinos.

Entre os métodos utilizados para avaliar a contagem celular, pode-se citar o California Mastitis Test (CMT), a contagem microscópica direta e a contagem eletrônica.

A prova do CMT foi padronizada por Schalm & Noorlander (1957) e mede indiretamente a concentração de leucócitos no leite (Paape et al. 1963, Silva et al. 1996). Em caprinos, o CMT negativo é um bom indicador da inexistência de infecções, porém um CMT positivo pode não ser indicativo de processos infecciosos da glândula mamária. Isto ocorre devido à presença das células epiteliais, em maior quantidade, quando comparada ao leite de vaca, que juntamente com leucócitos, reagem ao CMT levando a uma interpretação da prova diferente da usada em bovinos (Lewter et al. 1984). Uma média de 3% dos corpúsculos citoplasmáticos pode conter fragmentos de núcleo (Paape & Capuco 1996), que juntamente com as células epiteliais pode elevar, aparentemente, a concentração de leucócitos presentes no leite, mesmo em animais hígidos. Schalm et al. (1971) interpretaram a reação do leite de cabras ao CMT e relacionaram o número de células somáticas com a intensidade da reação. Os autores verificaram que cabras sem mamite podem apresentar reações traços ou 1+. Por outro lado, reações 2+ e 3+ podem ser indicativos importantes de inflamação intramamária. Smith & Roguinsky (1977) classificaram o leite dos animais analisados a partir do escore 1+, animais estes livres de infecções mamárias.

A contagem eletrônica de células somáticas pode ser realizada por contadores de partículas (Coulter Counter) e contadores baseados em citometria de fluxo (*Somacount* ou *Fossomatic*). O primeiro método é inespecífico, baseado na contagem de impulsos elétricos e, portanto, sofre influência da quantidade de glóbulos de gordura e partículas citoplasmáticas, resultando em contagens quase duas vezes maiores que as do *Fossomatic* ou *Somacount* (Poutrel & Lerondelle 1983).

Sabe-se que vários fatores, fisiológicos ou não, podem afetar a contagem de células somáticas, tais como número de lactações, idade do animal e fase da lactação (Fernandes 2002, Gomes 2003). Alguns autores ainda citam o efeito do estro (McDougall & Voermans 2002, Haenlein & Krauss 1974) e a administração de corticóides endógenos na contagem celular (Guidry et al. 1976).

A microscopia direta, padronizada por Prescott & Breed (1910), serve como método de controle dos contadores

eletrônicos, recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration) quando associado à coloração de verde de metil pironina-Y, para diferenciar as células nucleadas dos corpúsculos citoplasmáticos (Zeng 1996).

A contagem microscópica direta tem sido preconizada como um dos métodos mais confiáveis para a determinação do número de células somáticas no leite caprino, principalmente se forem utilizados corantes específicos de DNA, como o verde de metil e pironina-Y, pois diferencia as células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos (Zeng et al. 1999). Dulin et al. (1982) analisaram o leite de 24 fêmeas da espécie caprina por meio de contagem microscópica direta, comparando os corantes Wright, hematoxilina-eosina, "orange acridine", azul de tripan, verde de metil e pironina-Y e Levowitz-Weber; e contagem celular automática (Fossomatic e Coulter Counter), encontrando valores mais altos nas contagens quando se utilizaram os métodos não-específicos para DNA (Coulter Counter e corante Levowitz-Weber).

Diante da particularidade na fisiologia da secreção láctea caprina, pretendeu-se neste trabalho, determinar a contagem de células somáticas, pelo método indireto California Mastitis Test, e pelos métodos diretos, incluindo a contagem por citometria de fluxo e a contagem microscópica direta, através da coloração de verde de metil e pironina-Y, além de comparar os métodos de contagem celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 102 amostras de leite, provenientes de 51 fêmeas caprinas, das raças Saanen, Parça Alpina e Toggenburg, apresentando diferentes fases da lactação entre os animais, criadas em quatro propriedades localizadas no Estado de São Paulo.

Antes da colheita das amostras de leite, os animais foram selecionados em linha de ordenha, através do exame físico da glândula mamária, segundo os procedimentos descritos por Grunert (1993), sendo excluídos todos os que apresentaram qualquer alteração orgânica a este exame. A fase da lactação foi categorizada em: inicial (três primeiros meses da lactação); intermediária (quarto ao sexto mês de lactação), e final (sétimo ao oitavo mês de lactação). Os animais que não se enquadravam nestas fases foram eliminados da pesquisa.

Após o exame físico da glândula mamária, realizou-se a limpeza dos tetos com solução clorada e posterior secagem com papel toalha. Na seqüência foi realizada a prova do CMT, segundo os procedimentos descritos por Schalm & Noorlander (1957). Para a interpretação dos resultados, foi aplicado o mesmo critério adotado por Schalm et al. (1971).

Antes do início da ordenha foram colhidas, das metades mamárias, amostras de leite, divididas em duas alíquotas. A primeira alíquota de leite foi colhida em frascos plásticos com capacidade de 40 mL, contendo duas pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2nitropropane-1,3-diol), para a realização da contagem eletrônica de células somáticas. Para a realização da contagem microscópica direta, pela técnica de Prescott & Breed (1910), foi colhida uma segunda alíquota, em frascos de vidro com capacidade de 3mL, a qual foi transportada sob refrigeração ao laboratório.

As amostras de leite foram mantidas em banho-maria a 38°C, durante 15 minutos e a seguir, homogeneizadas, manualmente, sendo a contagem de células somáticas realizadas por citometria de fluxo (*Somacount 300* da empresa Bentley Instruments Inc.), e o resultado registrado em número de células somáticas/mL de leite.

Para a contagem microscópica direta, 10µL de leite foram distribuídos em uma área de 1 cm², em lâminas de microscopia, previamente limpas e desengorduradas, confeccionadas em duplicata para cada amostra de leite. A seguir, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, por 24 horas (Prescott & Breed 1910), fixadas em solução de *Carnoy's*, hidratadas e coradas em solução fresca preparada com verde de metil e pironina-y (Zeng 1996). O número de células foi determinado através da contagem em microscópio óptico comum com objetiva de imersão, calculando-se a média das contagens em duplicata e obtendo-se o valor do número de células/mL de leite.

Os números obtidos pelas diferentes técnicas de contagem foram relacionados com os resultados obtidos no CMT e com a fase de lactação.

Os resultados obtidos segundo as variáveis estudadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os valores das contagens de células somáticas apresentaram distribuição não paramétrica, sendo calculadas as medianas de cada parâmetro avaliado, e suas diferenças obtidas através do teste de Kruskal-Wallis (Sampaio 1998). Quando necessário foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre duas variáveis; estabelecida a regressão linear entre duas variáveis, e sua significância avaliada por meio de análise variância (Snedcor & Cockram 1967).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, SAS Institute 2001).

RESULTADOS

Os valores medianos das contagens de células somáticas presentes no leite de cabras foram avaliados através de contador automático e microscopia direta, e analisadas de acordo com os diferentes escores do CMT, apresentando variação significativa de acordo com o avançar dos mesmos (Quadro 1).

Quadro 1. Valores medianos (número de células/mL) da contagem de células somáticas (CCS), realizada por meio de contador automático e pela microscopia direta, de acordo com os diferentes escores do Califórnia Mastitis Test (CMT) no leite de cabras sadias, segundo o número de amostras. São Paulo, 2005

Escores do CMT	Nº de amostras	CCS automática (número de células/mL)	CCS microscopia direta (número de células/mL)	Significância
Negativo	76	181.000 ^{Ad}	74.991 ^{Bd}	p<0,00001
Traços	9	578.000 ^{Ac}	271.396 ^{Bc}	p<0,017
1+	9	628.000 ^{Ac}	71.420 ^{Bd}	p<0,04
2+	6	1.421.500 ^{Ab}	640.995 ^{Bb}	p<0,04
3+	1	5.542.000 ^{Aa}	5.049.394 ^{Aa}	p>0,7
Significância		p<0,01	P<0,02	

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

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

Na contagem automática e microscópica direta, observou-se aumento de celularidade com o aumento da positividade ao CMT. Não houve diferença estatística entre os escores traços e 1+ na contagem celular automática e entre os escores negativo e 1+ na contagem microscópica direta (Quadro 1).

Os valores medianos obtidos na contagem celular automática, de acordo com as fases da lactação apresentou maior valor na fase intermediária quando comparada à fase inicial e final da lactação (Quadro 2). O valor mediano obtido durante toda a lactação foi de 406.000 células/mL de leite.

Quadro 2. Valores medianos (em número de células/mL) da contagem de células somáticas (CCS) presentes no leite de cabras sadias, realizada por meio de contador automático e pela microscopia direta, segundo as diferentes fases da lactação. São Paulo, 2005

Escores do CMT	CCS automática (número de células/mL)	CCS microscopia direta (número de células/mL)	Significância
Inicial	159.500 ^{Ab}	62.493 ^{Ba}	p<0.004
Intermediária	508.000 ^{Aa}	89.275 ^{Ba}	p<0.0003
Final	277.500 ^{Aa}	146.411 ^{Ba}	p<0.02
Significância	p>0,01	p>0,13	

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

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

Quadro 3. Valores medianos (número de células/mL) da contagem de células somáticas (CCS) presentes no leite de cabras sadias, de acordo com o método de contagem celular e número de amostras analisadas. São Paulo, 2005

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

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

Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas, determinada por microscopia direta, pela coloração de verde de metil e pironina-Y, nas fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente, não apresentaram diferenças entre as fases da lactação, embora o valor tenha sido crescente com o avançar da lactação. O valor mediano obtido durante toda a lactação foi de 142.840 células/mL de leite.

Os valores medianos obtidos através da contagem de células somáticas pelo método automático e pela microscopia direta foram de 406.000 e 142.840 células/mL de leite, respectivamente, existindo diferença estatística significativa entre estes valores (p<0.0001) (Quadro 3).

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

DISCUSSÃO

Os valores medianos das contagens celulares obtidas através de contador automático, correspondendo, respectivamente, aos escores negativo, traços, 1+, 2+ e 3+ do CMT, apresentaram diferenças estatísticas, observando-se que a celularidade aumenta com a intensidade da reação ao CMT, fato este já citado por outros autores (Schalm et al. 1971, Rota et al. 1994, Contreras et al. 1996, Silva et al. 1996).

A quantidade de células somáticas do leite, encontrada neste trabalho foi semelhante à observada por Contreras et al. (1996), que determinaram os valores das células somáticas e realizaram o exame bacteriológico do leite de cabras com e sem infecção mamária, sendo os valores semelhantes aos deste estudo somente nos animais livres de infecção, já que a presença de agentes bacterianos eleva consideravelmente a quantidade de células somáticas no leite.

Os valores encontrados foram inferiores aos encontrados por Silva et al. (1996), porém, os animais analisados por estes autores não estavam isentos de infecção mamária, o que poderia elevar o valor da contagem de células somáticas.

A contagem celular automática coincidiu com as contagens encontradas por Droke et al. (1993) e Paape et al. (2001). Alguns autores (Contreras et al. 1996, Silva 1997, Park & Humphrey 1986, Andrade et al. 2001, Fernandes 2002) encontraram valores médios maiores que os obtidos neste estudo. Sabe-se que o número de células somáticas presentes no leite é influenciado por diversos fatores não-infecciosos, tais como número de lactações, raça, ambiente de criação e tipo de ordenha empregado, fatos que poderiam justificar as diferenças nas contagens encontradas em relação aos trabalhos acima citados.

Com relação à contagem celular microscópica direta, determinada pela coloração de verde de metil e pironina-Y, comparando-se com os diferentes escores do CMT, encontrou-se um número maior na contagem celular no escore traços, quando comparado ao escore 1+, o que pode ser explicado pela subjetividade na utilização do escore traços para a determinação da celularidade do leite da espécie caprina (Schalm et al. 1971, Pettersen 1981, Smith & Roguinsky 1977). Houve aumento gradativo na celularidade de acordo com o aumento no escore do CMT, fato já esperado.

O valor obtido na contagem microscópica direta foi semelhante ao valor encontrado por Dulin et al. (1982), que, apesar de comparar diferentes corantes, encontrou diferença apenas nas metodologias não preconizadas para o leite de cabras, o que pode aumentar consideravelmente a celularidade, por não diferenciar os leucócitos dos corpúsculos citoplasmáticos. O valor encontrado por estes autores, utilizando o corante verde de metil e pironina-Y foi semelhante ao encontrado no presente trabalho.

O limite máximo de células que pode ser encontrado no leite de cabras de boa qualidade é de 1×10^6 células/mL, valor estipulado pelo Ministério da Agricultura dos

Estados Unidos (Zeng 1996). Na presente investigação obteve-se teor celular mediano menor que o estabelecido pelo órgão citado.

Os valores medianos de células somáticas, em número absoluto de células/mL, encontrados no leite, por meio da contagem automática, apresentaram diferenças quando comparou-se a fase inicial e intermediária da lactação. Sabe-se que o valor da contagem de células somáticas aumenta com o avançar da lactação, fato já relatado por diversos autores (Droke et al. 1993, Gonzalo 1995, Gomes 2003). Alguns autores (Park & Humphrey 1986, Droke et al. 1993, Gonzalo 1995) verificaram maiores níveis celulares nas primeiras semanas pós-parto, os quais diminuíram durante o período de máxima produção de leite, voltando a aumentar até o final da lactação, resultados também observados neste trabalho.

Observou-se diferença estatística entre a contagem celular automática e a microscópica direta ($p < 0.0001$). Este resultado se opõe ao apresentado pela maioria dos autores (Dulin et al. 1982, Droke et al. 1993, Zeng et al. 1999, Arcuri et al. 2004), contudo, a maioria das contagens realizadas nestes trabalhos ocorreu em contador automático calibrado com leite de vaca, enquanto no presente trabalho a calibração foi feita com leite de cabra. Estudos realizados utilizando-se citometria de fluxo demonstraram que existem diferenças marcantes entre a densidade e a granulação das células somáticas de vacas e cabras, resultando em função de número celulares diferentes (Dulin et al. 1982). Além disso, valores das contagens celulares realizadas em aparelho calibrado com leite de vaca são 27,3% maiores do que as obtidas com aparelho calibrado com leite de cabra (Zeng 1996), o que pode explicar as diferenças obtidas nas contagens de células somáticas entre os trabalhos citados.

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

No presente trabalho, observou-se correlação positiva entre os valores medianos totais, obtidos através das contagens celulares por método automático e microscopia direta, fato que foi observado também por Andrade et al. (2001), que encontraram uma correlação positiva de 76% entre a contagem microscópica direta e a automática e Pettersen (1981), que encontrou uma correlação de 82%.

CONCLUSÃO

A pironina é um corante específico de DNA e pode ser utilizado para diferenciar células que contém DNA de células que contém somente RNA ou corpúsculos citoplasmáticos, sendo um método de determinação celular reconhecido pelo FDA. Somando-se esta informa-

ção aos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a contagem microscópica direta é o método quantitativo mais confiável para a determinação da celularidade do leite de cabras, quando comparado aos métodos automático ou qualitativo (CMT) de contagem celular.

REFERÊNCIAS

- Andrade P.V.P., Souza M.R., Borges I. & Penna C.F.A.M. 2001. Contagem de células somáticas em leite de cabra. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(3). Disponível em <<http://www.scielo.br>>. Acesso em 25 ago. 2003.
- Arcuri E.F., Silva P.D.L., Brito J.R.F., Silva M.R. & Souza G.N. 2004. Emprego do SomaCount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. Ciência Rural 34(5):1497-1500.
- Contreras A., Sierra D., Corrales J.C., Sánchez A. & Marco J. 1996. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. Small Rumin. Res. 21:259-264.
- Droke E.A., Paape M.J. & DiCarlo A.L. 1993. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. J. Dairy Sci. 76(4):1035-1039.
- Dulin A.M., Paape M.J., Schultze W.D. & Weinland B.T. 1983. Effect of parity stage of lactation, and intramammary infection. J. Dairy Sci. 66(11): 2426-2433.
- Dulin A.M., Paape M.J. & Weinland B.T. 1982. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. J. Dairy Sci. 65:1247-1251.
- Fernandes M.A. 2002. Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras Saanen e Alpina, criadas no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, USP, São Paulo. 152p.
- Gomes V. 2003. Influência do estágio de lactação na secreção láctea de cabras (*Capra hircus*) Saanen. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo. 86p.
- Gonzalo C. 1995. Microbiological and hygienic quality of ewe and goat somatic cells and pathogens, p.59-70. Proc. 2nd Seminar on Production and Utilization of Ewe and Goat Milk, Crete. Int. Dairy Fed., Brussels.
- Grunert E. 1993. Sistema Genital Feminino, p.299-314. In: Rosenberger G. (Ed.), Exame Clínico dos Bovinos. 3^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 419p.
- Guidry A.J., Paape M.J. & Pearson R.E. 1976. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. Am. J. Vet. Res. 37(10):1195-1200.
- Haenlein G.F.W. & Krauss W.C. 1974. Effects of single injections of diethylstilbestrol on milk composition and count leucocytes in milk Holstein-Friesian cattle. Z. Tierphysiol. Tierernährung 34:50-60.
- Hinckley L.S. 1983. Somatic cell count in relation to caprine mastitis. Vet. Med. Small Anim. Clin. 78(8):1267-1271.
- Lewter M.M., Mullowney P.C., Baldwin E.W. & Walker R.D. 1984. Mastitis in goat. Compend. Cont. Educ. 6(7):417-425.
- McDougall S. & Voermans M. 2002. Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. J. Dairy Sci. 85(2):378-383.
- Paape M.J., Hafs H.D. & Snyder W.W. 1963. Variations of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stains or Pyronin Y-methyl green stain. J. Dairy Sci. 46(11):1211-1216.
- Paape M.J. & Capuco A.V. 1996. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. J. Anim. Sci. 75(2):565.
- Paape M.J., Poutrel B., Contreras A., Marco J.C. & Capuco A.V. 2001. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. J. Dairy Sci. 84(Suppl.E):237-244.

- Park Y.W. & Humphrey R.D. 1986. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat, and protein. *J. Dairy Sci.* 69:32-37.
- Perrin G.G. & Baudry C. 1993. Numérations cellulaires du lait de chevre. *Le Lait* 73(5/6):489-497.
- Pettersen K. 1981. Cell content in goats milk. *Acta Vet. Scand.* 22:226-237.
- Poutrel B. & Lerondelle C. 1983. Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. *J. Dairy Sci.* 66(12):2575-2576.
- Prescott S.C. & Breed R.S. 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* 7:632-640.
- Rota A.M., Rojas A., Martin L., Rodriguez P. & Tovar J.J. 1994. Uso de la prueba de California para la deteccion de mamits en el ganado caprino. *Avances en Alim. y Mej. Anim.* 2(34):67-69.
- Sampaio I.B. 1998. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 221p.
- SAS Institute 2001. *SAS User's Guide: Statistics*. Cary. 956p.
- Schalm O.W. & Noorlander D.O. 1957. Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130(5):199-207.
- Schalm O.W., Carrol E.J. & Jain N.C. 1971. Bovine mastitis: Physical and chemical tests for detection of mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia, p.128-157.
- Snedcor G.W. & Cochran W.G. 1967. *Statistical Methods*. 6th ed. Iowa State University Press, Ames. 593p.
- Sierra D., Sánchez A. & Corrales J.C. 1998. Differential cell counts in goat's milk, p.178-180. In: *Milking and Milking Production of Dairy Sheep and Goats*. Proc. 6th International Symposium on the Milking of Small Ruminants, 1999, Athens, Wageningen.
- Silva E.R. 1997. Estudo de algumas fontes de variação do conteúdo celular do leite de cabra. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 62p.
- Silva E.R., Saukas T.N., Alves S.F.A. & Pinheiro R.R. 1996. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. *Revta Bras. Med. Vet.* 18(2):78-83.
- Smith M.C. & Roguinsky M. 1977. Mastitis and other disease of the goat's udder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171:1241-1248.
- Zeng S.S. 1996. Comparasion of goat milk standards with cow milk standads for analysis of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Rum. Res.* 21(3):221-225.
- Zeng S.S., Escobar E.N., Hart S.P., Hinckley L., Baulthaus M., Robinson G.T. & Jahnke G. 1999. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Rumin. Res.* 31:103-107.