

Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra

Use of Somacount 300, calibrated with cow milk standard, for somatic cell count in goat milk

Edna Froeder Arcuri¹ Priscilla Diniz Lima da Silva² José Renaldi Feitosa Brito³
Marcio Roberto Silva⁴ Guilherme Nunes Souza⁴

RESUMO

Neste estudo, foi comparada a contagem de células somáticas (CCS) de amostras pareadas de leite de 86 cabras pelo método eletrônico (Somacount 300) calibrado com padrão de vaca, com a técnica padrão de contagem microscópica direta utilizando corante pyronina Y – verde de metila. As cabras eram das raças Saanen e Toggenburg de um criatório localizado na Zona da Mata de Minas Gerais. Em complementação, foi avaliado o efeito do conservante Bronopol® no leite de cabras sobre a CCS. Para as 86 amostras de leite sem conservante, a média das leituras de CCS determinadas com o microscópio foi menor e diferiu ($p \leq 0,05$) da média de CCS lidas pelo Somacount 300 padronizado com leite de vaca. Porém, a média de leituras de CCS das 86 amostras com Bronopol® lidas no microscópio não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à obtida com o Somacount 300; e a curva de estimação de CCS no microscópio em função do Somacount foi significativa em nível de 95% com alta correlação, demonstrando a possibilidade de se utilizar o Somacount 300 padronizado com leite de vaca para leituras de CCS de leite de cabras conservado com Bronopol® dentro dos limites de CCS analisados neste estudo.

Palavras-chave: leite de cabra, contagem microscópica de células somáticas, contagem eletrônica de células somáticas.

ABSTRACT

In this study, there was a comparison of SCC from paired milk samples of 86 goats by the electronic method (Somacount 300) calibrated with cow milk standard, with the

pyronin Y-methyl green stain direct microscopic method. The goats were of Saanen and Toggenburg breeds from a farm located at the Zona da Mata of the Minas Gerais State. In addition, was evaluated the effect of Bronopol® on the SCC in goat milk was evaluated. For the unpreserved 86 milk samples, the SCC mean determined with the microscopic method was smaller and differed ($p \leq 0.05$) from that obtained with the Somacount 300 calibrated with cow milk. However, the SCC mean of the 86 milk samples with Bronopol® did not differ between the two methods ($p > 0.05$). The estimated SCC curve for the microscopic in function to the Somacount significant with high correlation, demonstrating the possibility of using the Somacount 300 calibrated with cow milk for counting somatic cells in goat milk preserved with Bronopol® within the range of SCC analyzed in this study.

Key words: goat milk, microscopic somatic cell count, electronic somatic cell count.

INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas (CCS) é usada como indicador de qualidade do leite tanto para vacas como para cabras (HAENLEIN, 1996; OSTERAS & LUNDER, 1996, HAENLEIN, 2002). Normalmente, a CCS no leite de cabras não infectadas é maior que no leite de vacas não infectadas. A CCS no leite de vacas livres de infecção intramamária é, em geral, inferior a 200.000 células/ml de leite (National Mastitis Council, 1996) e no leite de cabras não infectadas, inferior a 400.000 células/ml (McDOUGALL et al., 2001).

¹Engenheiro de alimentos, PhD, Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, 36038-330, Juiz de Fora, MG. E-mail: edna@cnp.gl.embrapa.br

²Estudante de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

³Médico Veterinário, PhD, Pesquisador Embrapa Gado de Leite.

⁴Médico Veterinário, MSc, Pesquisador, Embrapa Gado de Leite.

A CCS mais elevada no leite de cabra é atribuída à maneira como o leite é secretado pela glândula mamária. Na espécie bovina, a glândula mamária é classificada como merócrina pois somente o produto (leite) sintetizado pela glândula é secretado. Na espécie caprina, a glândula é classificada como apócrina, sendo o produto de secreção eliminado juntamente com pequena parte da célula (POUTREL & LERONDELLE, 1982; ZENG & ESCOBAR, 1996).

Procedimentos de contagem que são específicos para identificação do DNA, contador celular eletrônico e contagem celular por microscopia direta usando corante específico para DNA, devem ser usados para estimar a concentração de células somáticas no leite de cabras, pois estes diferenciam células nucleadas de partículas citoplasmáticas (DULIN et al., 1982; HINCKLEY, 1984; HINZ et al., 1992). O método de microscopia direta em que se usa o corante pyronina Y - verde de metila é um teste confirmativo reconhecido e deve ser usado como método padrão de referência de leite de cabra e amostras desconhecidas (ZENG et al., 1999).

ZENG & ESCOBAR (1996) e ZENG et al. (1999) verificaram que a CCS no leite de cabras foi respectivamente 27,0% e 24,5% menor quando o equipamento Fossomatic 300 foi calibrado com leite padrão de cabra em relação ao mesmo equipamento calibrado com leite padrão de vaca.

Este estudo objetivou comparar a CCS de leite de cabras pelo método eletrônico em equipamento Somacount 300 calibrado com padrão de vaca em relação à contagem microscópica direta utilizando corante Y-pyronina. Em complementação, foi avaliado o efeito do conservante Bronopol[®] sobre a CCS.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram coletadas amostras pareadas de leite de 86 cabras das raças Saanen e Toggenburg de um criatório localizado no Município de Coronel Pacheco, Zona da Mata, Minas Gerais. As cabras diferiam em idade, porém todas estavam no primeiro terço da lactação e nenhuma apresentou sintoma de mastite clínica. Após o exame dos primeiros jatos em caneca de fundo escuro, as extremidades das tetas foram higienizadas com solução de etanol a 70%. As amostras foram coletadas diretamente em frascos estéreis. A um grupo de 86 amostras foi adicionado o conservante Bronopol[®] na concentração de 0,05g por 100 mL de leite segundo a International Dairy Federation (IDF-FIL, 1995). Os frascos foram transportados em caixa isotérmica

contendo gelo até o Laboratório de Qualidade do Leite na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, onde as amostras foram analisadas para CCS no dia seguinte à coleta.

Contagem de células somáticas

A contagem eletrônica de células somáticas foi efetuada no equipamento Somacount 300, calibrado com leite de vaca, de acordo com recomendações da International Dairy Federation (IDF-FIL, 1995).

A CCS pela microscopia direta foi realizada de acordo com ZENG et al. (1999), com preparo de soluções segundo PACKARD et al. (1992) e do esfregaço segundo International Dairy Federation (IDF-FIL, 1995). Para cada amostra de leite, foram feitos três esfregaços de 1,0cm² com 0,0 ml de leite. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente, para que os esfregaços secassem completamente. Os esfregaços foram fixados com a solução de Carnoy por cinco minutos, depois hidratados por um minuto com cada uma das seguintes soluções: etanol 50%, etanol 30% e água destilada, em seqüência, e corados por seis minutos com o corante PYMG (pyronine Y-methyl green). Cada esfregaço foi seco completamente, imerso em butanol, por um minuto, em água destilada durante um minuto e seco novamente. De cada esfregaço, foram examinados 50 campos. A CCS foi calculada com o fator do microscópio de 390.000.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do Teste T de Student para amostras pareadas, correlação de Pearson e modelos de regressão linear (SAMPAIO, 2002). O programa estatístico usado foi o SPSS (MORGAN et al., 2001). Para comparação das médias, foi realizada a transformação logarítmica neperiana nos dados originais de CCS. Os testes foram realizados ao nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Os dados das amostras que apresentaram valores de CCS extremos pelos dois métodos foram eliminados, restando após essa filtragem 65 observações pareadas.

O intervalo de CCS estudado após a eliminação dos valores extremos foi de 24.000 a 2.549.000 células mL⁻¹.

Para ajustar os valores do Somacount aos do microscópio, foi determinado um fator (coeficiente b de regressão) no modelo $Y = bX$, em que Y corresponde às leituras no microscópio e X às leituras do Somacount.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de CCS utilizados no presente ensaio baseiam-se na coloração do DNA, e, portanto, diferenciam células somáticas de partículas citoplasmáticas presentes em leite de cabras. Para as amostras de leite sem conservante, a média das leituras de CCS determinadas com o microscópio foi menor e diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) da média de CCS lidas pelo Somacount 300 padronizado com leite de vaca (Tabela 1). Foi observado na análise microscópica que amostras sem o conservante, em geral, apresentavam maior número de células desintegradas que causavam dificuldades na interpretação e que podem ter interferido na contagem.

A média das leituras de CCS das amostras com Bronopol[®] realizadas pelo Somacount 300 padronizado com leite de vaca no presente ensaio não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) da média de CCS determinada microscopicamente nas amostras coradas por Pyronina-Y (Tabela 1). Entretanto, ZENG & ESCOBAR (1996) e ZENG et al. (1999) verificaram que a CCS foi respectivamente 27,0% e 24,5% menor quando o equipamento Fossomatic 300 foi calibrado com leite padrão de cabra em relação ao mesmo equipamento calibrado com leite padrão de vaca.

Foi estabelecida uma curva de estimação linear, sem o termo constante “a”, objetivando determinar um fator de ajuste para os valores encontrados no Somacount aos da microscopia. Para o ajuste dos dados originais de CCS, o fator foi de 0,98 e, para os dados transformados em logaritmo neperiano, foi de 0,99. A correspondência linear entre os dois métodos é apresentada na figura 1.

A análise de variância para as amostras com conservante apresentou um coeficiente de variação (CV) de 16,45% nos dados não transformados de CCS e 2,72% após a transformação logarítmica, e para as amostras sem conservante, estes valores foram de 17,78% e 2,74%, respectivamente. Esses valores de

Tabela 1 - Comparação de médias das contagens de células somáticas para amostras de leite com e sem conservante, pelo método eletrônico e por contagem microscópica direta.

Tratamento	Conservante*	
	Sem	Com
Contagem eletrônica	583.830 a	633.246 a
Microscopia	557.922 b	606.861 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T ($p < 0,05$).

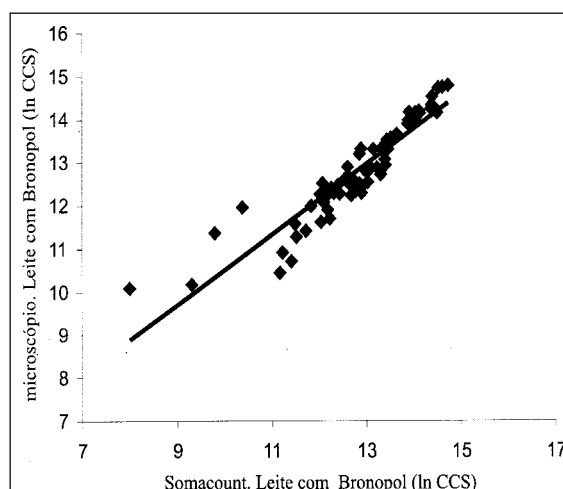


Figura 1 – Curva de tendência linear da dispersão dos resultados (X,Y), sendo X = Ln da contagem de células somáticas (CCS) lida no Somacount 300 e Y = Ln CCS lida no microscópio

CV, considerados médios, indicam boa confiabilidade nos resultados encontrados em experimentos que envolva animais. SAMPAIO (2002) cita que, em experimentos com animais, em geral, o CV se situa na faixa de 20 a 30%.

CONCLUSÃO

A utilização do método automatizado, padronizado com leite de vaca, é apropriado para leituras de CCS de leite de cabras dentro dos limites considerados neste estudo de 24.000 a 2.549.000 células ml⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v.45, p.435-439, 1982.
- HAENLEIN, G.F.W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**, v.45, n.2, p.163-168, 2002.
- HAENLEIN, G.F.W. Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1173-1181, 1996.
- HINCKLEY, L.S. The somatic cell count issue. **Dairy Goat Journal**, v.8, n.62 p.672, 1984.
- HINZ, C.W. et al. Methods to detect abnormal milk. In: MARSHALL, R. (ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington, DC : American Public Association, 1992. p.327-346.

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk: Enumeration of somatic cell.** Brussels: IDF/FIL, 1995. (IDF Standard 148 A). 8p.
- McDOUGALL, S. et al. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacterial status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small ruminant Research**, v.40, n.3, p.245-254, 2001.
- MORGAN, G.A.; GRIEGO, O.V.; GLOECKNER, G.W. **SPSS for Windows – An introduction to use and interpretation in research.** New Jersey : LEA Publishers, 2001. 214p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis.** 4.ed. Madison : National Mastitis Council, 1996. 64p.
- OSTERAS, O.; LUNDER, T. Bulk milk somatic cell count in goat milk. **Mastitis Newsletter**, v.21, p.23-25, 1996. (Newsletters of the International Dairy Federation, 144).
- PACKARD, V.S. JR. et al. Direct microscopic methods for bacteria or somatic cells. In: MARSHALL, R. (ed.). **Standard methods for the examination of dairy products.** 16.ed. Washington, DC : American Public Association, 1992. p.309-325.
- POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. **Journal Dairy Science**, v.66, n.12, p.2575-2579, 1982.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 2.ed. Belo Horizonte : Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 265p.
- ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk . **Small Ruminant Research**, v.21, n.3, p.221-225, 1996.
- ZENG, S.S. et al. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, v.21, n.2, p.103-107, 1999.