

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS PRESENTES NO LEITE DE CABRAS SADIAS UTILIZANDO-SE A COLORAÇÃO DE VERDE DE METIL E PIRONINA E A CITOCENTRIFUGAÇÃO

K.M. Madureira¹; V. Gomes²

¹Centro Universitário Anhanguera, Rua Waldemar Silenci, 340, CEP 13614-370, Leme, SP, Brasil. E-mail: karina.madureira@unianhanguera.edu.br

RESUMO

As particularidades da secreção láctea do tipo apócrina, na espécie caprina, tornam necessárias técnicas específicas para a determinação da quantidade e da qualidade das células presentes no leite desta espécie. Dentre estas particularidades, pode-se citar a presença dos corpúsculos citoplasmáticos. De acordo com estas características, o objetivo do presente trabalho foi determinar a contagem total de leucócitos no leite de cabras sadias, por meio da contagem microscópica direta com verde de metil e pironina-Y, e a contagem celular automática por citometria de fluxo, assim como determinar os tipos leucocitários, através da técnica de citocentrifugação. Foram analisadas 102 de leite de cabras sadias, das raças Saanen, Parda Alpina e Toggenburg. O valor mediano obtido pela contagem microscópica direta e automática foi de 142.840 e 406.000 células somáticas/mL de leite, respectivamente. Os valores médios obtidos na citocentrifugação foram de 73,24 ± 18,35% de neutrófilos, 3,55 ± 3,06% de linfócitos e 24,33 ± 18,89% de monócitos e células epiteliais. De acordo com os resultados, pode-se concluir que o valor obtido pela coloração de verde de metil e pironina-Y é significativamente menor, sendo um importante método para a determinação da celularidade presente no leite de cabras, pois exclui os corpúsculos citoplasmáticos característicos desta espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Células, leite, pironina.

ABSTRACT

TOTAL AND DIFFERENTIAL LEUKOCYTE COUNTS IN THE MILK OF HEALTHY GOATS, USING METHYL GREEN-PYRONIN STAIN AND CYTOCENTRIFUGATION. The characteristics of the apocrine milk secretion observed in goats make it necessary to use specific techniques to determine the quantity and quality of cells found in this kind of milk. Among these characteristics is the presence of cytoplasmic bodies. The objective of the present study was to determine total leukocyte counts in the milk of healthy goats using direct microscopy and methyl green-pyronin Y and automatic cell count by flow cytometry as well as to determine leukocyte types by means of cyto centrifugation. A total of 102 milk samples from healthy Saanen, Brown Alpine and Toggenburg goats were analyzed. The median value of direct microscopic and automatic counts was 142,840 and 406,000 somatic cells/mL of milk, and mean values obtained in cyto centrifugation were 73.24 ± 18.35% neutrophils, 3.55 ± 3.06% lymphocytes and 24.33 ± 18.89% monocytes and epithelial cells. According to the results obtained, it was concluded that methyl green-pyronin Y is an important method, perhaps the most precise one, for determining cell counts in goat milk, because it excludes cytoplasmic bodies. Moreover, the different cell types found in milk are important defenses of the mammary gland against mastitis-causing pathogens.

KEY WORDS: Cells, milk, pyronin.

A glândula mamária das cabras é composta por ácinos, constituídos de células epiteliais. Durante a secreção láctea do tipo apócrina, diferente da secreção merócrina da vaca (DULIN *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 corpúsculos ou partículas citoplasmáticas, de tamanhos variáveis, normalmente grandes, de 5-30 µm, cujas dimensões e morfologia são semelhantes aos leucócitos (DULIN *et al.*, 1983;

²Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Curitiba, PR, Brasil.

PERRIN; BAUDRY, 1993). Essas partículas são anucleadas em sua maioria (PAAPE; CAPUCO, 1996), com interior preenchido por glóbulos de gordura (PERRIN; BAUDRY, 1993) e correspondem a cerca de 35% dos elementos celulares observados no leite de cabras (SIERRA *et al.*, 1999), estando ausentes no leite de vacas (GONZALO, 1995; PARK; HUMPHREY, 1986; PERRIN; BAUDRY, 1993). As partículas citoplasmáticas aumentam aparentemente a concentração de leucócitos no leite caprino, necessitando assim de metodologias específicas de contagem celular para esta espécie (SILVA *et al.*, 1996; DROKE *et al.*, 1993; DULIN *et al.*, 1983; HINCKLEY, 1983).

A contagem celular por microscopia direta foi padronizada por PRESCOTT; BREED (1910), e serve como método de controle aos contadores eletrônicos, recomendado pelo "Food and Drug Administration" quando associado à coloração de verde de metil e pironina-Y, para diferenciar as células nucleadas dos corpúsculos citoplasmáticos presentes no leite de cabras (ZENG *et al.*, 1999).

Vários trabalhos (DULIN *et al.*, 1982; DULIN *et al.*, 1983; POUTRELL; LERONDELLE, 1983; STEHLING *et al.*, 1988; DROKE *et al.*, 1993; GONZALO, 1995; ZENG, 1996; WHITE; HINCKLEY, 1999; ZENG *et al.*, 1999; DAS; SINGH, 2000; ARCURI *et al.*, 2004) já foram conduzidos visando estabelecer o valor total de células somáticas no leite de cabras, porém, apenas uma quantidade menor de autores utilizou como método de contagem a microscopia direta, associando à coloração de verde de metil e pironina-Y (DULIN *et al.*, 1982; ZENG *et al.*, 1999; ARCURI *et al.*, 2004; DROKE *et al.*, 1993; DULIN *et al.*, 1982; DAS; SINGH, 2000), ressaltando-se desta forma a importância de se comparar as técnicas automática e microscópica direta para o leite caprino.

A contagem diferencial de células somáticas é um método qualitativo que estabelece a proporção dos diferentes tipos celulares presentes no leite. DULIN *et al.* (1982) avaliaram amostras de leite de cabras sadias e obtiveram médias de 66,2; 0,4; 32,8 e 0,6% de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, respectivamente. PERRIN; BAUDRY (1993) estudaram a proporção celular em animais sadios e observaram os intervalos médios de 45 a 74%; 9 a 20% e 15 a 41% de polimorfonucleares, linfócitos e monócitos, respectivamente. BARBOSA *et al.* (2001) avaliaram a citologia do leite de oito cabras durante 16 semanas, obtendo intervalos médios de 57,9 a 88,9; 5,9 a 17,6 e 5,1 a 24,4% de granulócitos, linfócitos e macrófagos, respectivamente.

Em função da importância em se determinar a quantidade de células somáticas, como parâmetro da higidez da glândula mamária e qualidade do leite de cabras, o objetivo deste trabalho foi determinar a contagem celular total de células somáticas presentes no leite de cabras sadias, por meio dos métodos automático e microscópico direto, além da contagem

celular diferencial, utilizando-se a técnica de citocentrifugação.

Foram analisadas 102 amostras de leite, provenientes de 51 fêmeas caprinas, das raças Saanen, Parda Alpina e Toggenburg, oriundas de quatro propriedades localizadas no Estado de São Paulo. Os animais foram selecionados em linha de ordenha, após a realização do exame físico, segundo a metodologia prescrita por DIRKSEN (1993), excluindo da pesquisa animais que apresentaram qualquer alteração orgânica. Além disso, utilizou-se também como critério de seleção amostral a negatividade das amostras de leite ao exame bacteriológico.

Para a contagem de células somáticas pelo método automático, as amostras de leite foram mantidas em banho-maria a 38° C, durante 15 minutos e, a seguir foram homogeneizadas manualmente, sendo a contagem realizada por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento *Somacount* 300 da empresa Bentley Instruments Inc., com o resultado registrado em número de células somáticas/mL de leite.

Na contagem microscópica direta, pela técnica de PRESCOTT; BREED (1910), 10 µL de leite foram distribuídos em uma área de um cm², em lâmina de microscopia. A seguir, as lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas, fixadas em solução de *Carnoy's* e coradas em solução fresca preparada com pironina-Y e verde de metil (ZENG *et al.*, 1999). Para avaliação do número de células, foram contados 100 campos, utilizando-se microscópio óptico comum com objetiva de imersão. O resultado das contagens de cada amostra foi obtido calculando-se a média das contagens em duplicata e multiplicado pelo fator do microscópio, obtendo-se o valor do número de células/mL de leite.

As amostras de leite destinadas a realização da contagem diferencial dos leucócitos foram colhidas em frascos de polipropileno tipo *Falcon*, estéril, com capacidade para 50 mL, já contendo 45 mL de PBS (solução salina tamponada). As amostras foram centrifugadas á 450 G (2000 rpm) por 20 minutos em refrigeração de 4° C.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o botão de células foi desprendido do frasco pela aspensão, em fracos jatos de PBS, para, a seguir, homogeneizar o conteúdo, completando com PBS refrigerada. Esta técnica foi realizada mais duas vezes e, após a terceira e última ressuspensão em um mL de PBS, uma alíquota de 100 µL de cada suspensão celular de todas as amostras de leite foram submetidas a citocentrifugação a uma força centrífuga relativa (FCR) de 28 g (450 rpm) durante 6 minutos. As lâminas foram confeccionadas em duplicata e coradas pelo método de ROSENFELD (1947), sendo analisadas segundo a qualidade e tipos celulares predominantes, sendo os resultados obtidos expressos em porcentagem. Em virtude da semelhança morfológica

entre os monócitos e as células epiteliais, a porcentagem destas células foi apresentada conjuntamente.

Os valores celulares medianos obtidos para a contagem celular automática e microscópica direta foi de 406.000 e 142.840 células/mL de leite (Tabela 1).

A contagem celular automática coincidiu com as contagens encontradas por DROKE *et al.* (1993) e PAAPE *et al.* (2001).

Tabela 1 - Contagem total de células somáticas, por meio dos métodos automático e microscópico direto, presentes no leite de cabras sadias. São Paulo, 2006.

Método de contagem celular	Contagem de células somáticas células/mL
Contador automático	406.000 ^a
Microscopia direta	142.840 ^b
Significância	$p < 0,0001$

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

O valor mediano determinado pela técnica microscópica direta foi semelhante ao encontrado por DULIN *et al.* (1982), que utilizaram a mesma metodologia de contagem e coloração dos esfregaços lácteos da utilizada neste trabalho.

ARCURI *et al.* (2004) e ZENG *et al.* (1999) utilizaram a coloração de verde de metil e pironina-Y para determinar a celularidade em amostras de leite de cabras, sem sinais de mamite clínica, e encontraram o valor médio de 557.922 células/mL e 611.000 células/mL de leite, respectivamente. No entanto, o exame bacteriológico das amostras de leite não foi realizado neste trabalho, fato que poderia explicar a quantidade maior de células somáticas, quando comparada aos animais avaliados na presente pesquisa.

DAS; SINGH (2000) utilizaram como coloração para os esfregaços lácteos o azul de metileno, corante não preconizado pelo FDA para o leite da espécie caprina, pois não cora o DNA das células, levando resultados superiores quando se utiliza um corante que exclui a possibilidade de coloração das partículas citoplasmáticas.

A pironina é um corante específico de DNA, podendo ser utilizado para diferenciar células que contém DNA de células que contém somente RNA ou corpúsculos citoplasmáticos (DULIN *et al.*, 1982), sendo um método de determinação celular reconhecido pelo FDA.

Os valores médios totais dos diferentes tipos leucocitários encontrados foram de 73,24 ± 18,35% de neutrófilos, 3,55 ± 3,06% de linfócitos e 24,33 ± 18,89% de monócitos e células epiteliais (Tabela 2), com valo-

res semelhantes aos encontrados por DULIN *et al.*, (1982) e DROKE *et al.* (1993). Os valores de neutrófilos e monócitos encontrados neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por BARBOSA *et al.* (2001) e PERRIN; BAUDRY (1993). Os valores de linfócitos encontrados nesta pesquisa foram inferiores aos encontrados por BARBOSA *et al.* (2001), que avaliaram a celularidade total e diferencial dos leucócitos presentes no leite e sangue de cabras, de diferentes raças e em várias fases da lactação. Os autores relataram que estes valores diferiram significativamente entre as semanas de lactação, o que poderia levar a diferença entre a porcentagem de linfócitos encontrada nos dois trabalhos.

Tabela 2 - Valores relativos (%) dos diferentes tipos leucocitários, presentes no leite de cabras sadias. São Paulo, 2006.

Tipo celular	Valores relativos (%)
Neutrófilos	73,24 ± 18,35
Linfócitos	3,55 ± 3,06
Monócitos + células epiteliais	24,33 ± 18,89

Observou-se diferença estatística entre a contagem celular automática e a microscópica direta ($p < 0,0001$). É importante ressaltar que o citômetro de fluxo destinado a contagem de células somáticas presentes nas amostras utilizadas neste estudo foi calibrado com leite de vaca. Não se pode esquecer também da presença dos corpúsculos citoplasmáticos no leite de cabras, aparecendo em valores de 3 a 94% (DULIN *et al.*, 1982), fato que também pode alterar a contagem em aparelho calibrado com leite de vaca, não excluindo totalmente os corpúsculos citoplasmáticos.

Estudos realizados utilizando-se citometria de fluxo demonstraram que existem diferenças marcantes entre a densidade e a granulação das células somáticas de vacas e cabras, resultando em função e número celulares diferentes (DULIN *et al.*, 1982). Além disso, valores das contagens obtidas com aparelho calibrado com leite de vaca são 27,3% maiores do que as mesmas amostras quando submetidas a contagem com aparelho calibrado com leite de cabra (ZENG, 1996), proporção esta semelhante a encontrada neste trabalho, com valores celulares 34% maiores na contagem celular automática, ressaltando a importância de se padronizar técnicas específicas de contagem para a espécie caprina.

Entre todos os leucócitos presentes no leite de cabras, os neutrófilos normalmente aparecem em maior quantidade tanto em cabras infectadas quanto

não infectadas, correspondendo a valores de 45 a 74% das células somáticas nas cabras não infectadas e de 71 a 86% em cabras infectadas (PAAPE *et al.*, 2001), valores coincidentes aos desta pesquisa. Os monócitos e células epiteliais compreendem de 15 a 41% do total de células presentes no leite de cabras sadias (PAAPE *et al.*, 2001; DULIN *et al.*, 1982), valores estes semelhantes aos desta investigação.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a contagem celular pela técnica microscópica direta, utilizando-se a coloração de verde de metil e pironina-Y, foi menor quando comparada a contagem automática, confirmando a hipótese de que esta técnica de contagem é a mais indicada para a espécie caprina, por excluir os corpúsculos citoplasmáticos durante a contagem. Além disso, pôde-se observar que as células presentes em maior quantidade no leite de fêmeas caprinas sadias foram os neutrófilos, seguidas pelos monócitos, células epiteliais e linfócitos, garantindo a defesa imunológica da glândula mamária a patógenos causadores de mamite.

REFERÊNCIAS

- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.R.; SOUZA, G.N. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. *Ciência Rural*, v.34, n.5, p.1497-1500, 2004.
- BARBOSA, G.M.O.; NUNES PINHEIRO, D.C.S.; LOBO, R.N.B.; SANTIAGO, E.K.S.; COSTA, L.A. C. Contagem total e diferencial de leucócitos no leite de cabra da raça Saanen sem sinais clínicos de mastite. *Ciência Animal*, v.11, n.2, p.73-77, 2001.
- DAS, M.; SINGH, M. Variation in blood leucocytes, somatic cell count, yield and composition of milk of crossbred goats. *Small Ruminant Research*, v.35, p.169-174, 2000.
- DIRKSEN, G. *Exame clínico dos bovinos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.
- DROKE, E.A.; PAAPE, M.J.; DICARLO, A.L. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.4, p.1035-1039, 1993.
- DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; WEINLAND, B.T. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. *Journal Dairy Science*, v.65, p.1247-1251, 1982.
- DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; SCHULTZE, W.D.; WEINLAND, B.T. Effect of parity stage of lactation, and intramammary infection. *Journal of Dairy Science*, v.66, n.11, p.2426-2433, 1983.
- GONZALO, C. Microbiological and hygienic quality of ewe and goat somatic cells and pathogens. In: SEMINAR ON PRODUCTION AND UTILIZATION OF EWE AND GOAT MILK, 2., 1995, Crete. *Proceedings*. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.59-70.
- HINCKLEY, L.S. Somatic cell count in relation to caprine mastitis. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, v.78, n.8, p.1267-1271, 1983.
- PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal of Animal Science*, v.75, n.2, p.565, 1996.
- PAAPE, M.J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J.C.; CAPUCO, A.V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal Dairy Science*, v.84, p.237-244, 2001. Supplement E.
- PARK, Y.W.; HUMPHREY, R.D. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat, and protein. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.32-37, 1986.
- PERRIN, G.G.; BAUDRY, C. Numérations cellulaires du lait de chevre. *Le lait*, v.73, n.5/6, p.489-497, 1993.
- PRESCOTT, S.C.; BREED, R.S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *Journal of Infection Disease*, v.7, p.632-640, 1910.
- POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter, and fossalomatic for predicting half infection. *Journal of Dairy Science*, v.66, n.12, p.2575-2576, 1983.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, v.20, p.329-335, 1947.
- SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C. Differential cell counts in goat's milk. In: MILKING AND MILKING PRODUCTION OF DAIRY SHEEP AND GOATS, 1998, Athens. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE MILKING OF SMALL RUMINANTS, 6, 1999, *Proceedings*. Athens: Wageningen, 1999. p.178-180.
- SILVA, E.R.; SAUKAS, T.N.; ALVES, S.F.A.; PINHEIRO, R.R. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.18, n.2, 1996.
- STEHLING, R.N.; VARGAS, O.L.; SOUZA, H.M.; PORTUGAL, H.T.B. Relação entre a contagem microscópica direta e os testes "California Mastitis Test" e "White Side" na determinação de células somáticas em

leite caprino. *Revista do Laticínio Cândido Tostes*, v.43, n.258, 1988.

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

ZENG, S.S. 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, p.221-225, 1996.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; HART, S.P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G.T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research*, v.31, p.103-107, 1999.

Recebido em 27/2/09

Aceito em 25/1/10