

## Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino

[Comparison between standard method and electronic analyses for measurement of the bovine milk somatic cell count]

T.M.L. Silveira<sup>1</sup>, L.M. Fonseca<sup>2\*</sup>, T.B.N. Lago<sup>3</sup>, D.R. Veiga<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Medicina Veterinária

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Escola de Veterinária da UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica – EVUFMG

<sup>4</sup>Químico - Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - Curitiba, PR

### RESUMO

Avaliou-se a metodologia eletrônica de determinação da contagem de células somáticas por citometria de fluxo, utilizando-se 48 amostras individuais de leite de vaca da raça Holandesa e cinco amostras de leite de conjunto. A contagem média de células somáticas das amostras individuais foi de 353.000 cel/ml (5,55log cel/ml) usando-se metodologia de referência e 328.000 cel/ml (5,52log cel/ml) usando-se o contador eletrônico. Para amostras de tanque, as médias foram 382.000 cel/ml (5,58log cel/ml) e 329.000 cel/ml (5,52log cel/ml) de CCS, respectivamente, para análise feita por microscopia direta e pelo equipamento eletrônico. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os valores obtidos nas análises realizadas pelo método de referência e pelo analisador eletrônico rápido. Foi avaliada a qualidade das amostras-padrão de origem americana e canadense, por meio da contagem de células somáticas, pelo método de microscopia direta. Os resultados foram comparados aos valores declarados no laudo de análise das amostras, emitidos pelo laboratório fornecedor das amostras-padrão.

Palavras-chave: microscopia direta, CCS, contadores eletrônicos, qualidade do leite

### ABSTRACT

*In order to evaluate the electronic counting of somatic cell count by flow cytometry, 48 raw milk samples from Holstein cows and 5 bulk tank samples were analyzed for somatic cells counting. The mean of somatic cells counting (SCC) for raw milk samples were 353,000 cells/ml (5.55log cells/ml) using the standard methods and 328,000 cells/ml (5.52log cells/ml), using electronic equipment. For the bulk tank samples the SCC means were 382.000 cells/ml (5.58log cells/ml) using the direct microscopic and 329.000 cells/ml (5.52log cells/ml) using the electronic equipment. The differences between values obtained by both analytical methods were not significant ( $P>0.05$ ). Additionally, the quality of the American and Canadian standard samples was evaluated by determination of the SCC, using the reference methods to compare to the results issued by the supplier laboratory.*

*Keywords: direct microscopic, somatic cell count, electronic somatic cell count, milk quality*

---

Recebido para publicação em 3 de dezembro de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 1 de outubro de 2004

\*Autor para correspondência

E-mail: labufmg@vet.ufmg.br

## INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora de produção higiênica do leite (Smith, 1996).

O conjunto de células brancas e células epiteliais presentes no leite é denominado células somáticas (Philpot e Nickerson, 1991; Harmon, 1998). As células epiteliais são oriundas da descamação normal do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária e compreendem de 2% a 25% do total de células. As células brancas, de defesa ou leucócitos, constituem 75% a 98% do total de células e migram do sangue para o úbere no caso de infecção ou agressão (Ribas, 2001).

Os níveis de células somáticas no leite bovino podem ser determinados utilizando-se várias técnicas de diagnóstico, que são divididas em métodos diretos e indiretos. Como exemplo dos métodos indiretos podem ser citados o California Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT) e a medida da condutividade elétrica. Como exemplo dos métodos diretos tem-se a contagem de células somáticas por microscopia direta (DMSCC) e os analisadores eletrônicos.

A metodologia de referência para a contagem de células somáticas no leite demanda muito tempo para ser realizada, não sendo o método mais recomendado para monitorar a qualidade do leite de rebanhos com grande número de animais. Os equipamentos eletrônicos são utilizados pela Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como alternativa para facilitar o controle leiteiro e a avaliação da qualidade do leite.

Os analisadores eletrônicos baseiam-se em diferentes técnicas de análises, como a contagem de impulsos elétricos gerados pela passagem de partículas entre dois eletrodos, a fluorescência óptica e a citometria de fluxo (Babak e Rysanek, 1999). No princípio da fluorescência óptica, o DNA das células é corado e ao ser estimulado por uma fonte de luz, emite fluorescência. A energia emitida é medida como pulsos elétricos e convertida em quantidade de células somáticas presentes na amostra (Christen, 1993). Na

citometria de fluxo as células coradas são carregadas por um líquido sendo excitadas por um feixe de laser. Os núcleos corados emitem, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um foto multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (Cecalait, 1993).

No Brasil, os equipamentos mais utilizados são o Fossomatic<sup>1</sup> e o Somacount<sup>2</sup>. O contador eletrônico Somacount 500 – Bentley tem a capacidade de analisar 500 amostras por hora. Na análise, uma alíquota da amostra é coletada pelo instrumento, aquecida a 67°C e levada a uma seringa contendo o corante tampão. Em seguida 50µl da amostra são carregados até o *cell*, por um líquido carreador (RBS), onde ocorre a incidência de raio laser sobre a amostra, produzindo uma pequena explosão. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de ondas apropriados e é captada como pulso elétrico, que é ampliado, filtrado eletronicamente e convertido em contagem de células (Bentley Instruments, 1994).

Os objetivos do trabalho foram comparar os métodos de DMSCC e analisador eletrônico, e avaliar a qualidade das amostras-padrão de origens americana e canadense, utilizadas na calibração de analisadores eletrônicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

As contagens de células somáticas por microscopia direta foram realizadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG. As análises pelo contador eletrônico de células somáticas foram feitas no laboratório de controle leiteiro da Associação Paranaense dos Criadores de Rebanho Bovino da Raça Holandesa, localizado em Curitiba, PR.

Foram analisadas 48 amostras individuais de leite de vacas da raça Holandesa, de várias idades e diferentes estádios de lactação, escolhidas aleatoriamente em um rebanho, e cinco amostras de leite do tanque de resfriamento obtidas no mesmo local. Para a calibração do

<sup>1</sup> Foss Electric - Dinamarca

<sup>2</sup> Bentley Instruments Incorporated- Estados Unidos

contador eletrônico de células somáticas foram utilizadas sete partidas de amostras-padrão, quatro fornecidas pelo Dairy Quality Control Inc. (DQCI Service) e três pelo Dairy Herd Analysis System (DHAS). A calibração do contador eletrônico Somacount 500 foi realizada conforme procedimento descrito no manual de operação do equipamento (Bentley..., 1994).

Após completa homogeneização das amostras coletadas em duplicata, 250ml de leite foram transferidos para um frasco de vidro contendo tabletes do conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) na concentração de 8mg do ingrediente ativo para cada 40ml da amostra. O frasco foi homogeneizado por inversão até completa dissolução do comprimido e as amostras permaneceram sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises, conforme International... (1995). Sub-amostras foram obtidas e transferidas para um frasco de plástico com capacidade de 80ml e acondicionadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável. A

entrega no laboratório de destino, em Curitiba-PR, foi, no máximo, 12 horas após o despacho na companhia aérea.

O método de referência usado para determinar a quantidade de células somáticas presentes no leite foi o da microscopia direta (IDF, 1991; APHA, 1992). Os dados foram analisados por meio de estatísticas descritivas e análise de variância (SPSS 9.0), utilizando a transformação logarítmica das observações, de acordo com recomendação de Sampaio (1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da contagem de células somáticas das amostras-padrão de origem americana e canadense foi semelhante à fornecida no laudo de análise das amostras (Tab. 1), emitidos pelos laboratórios fornecedores das amostras. A estatística descritiva é apresentada na Tab. 2.

Tabela 1. Contagem de células somáticas (CCS) das amostras-padrão provenientes dos Estados Unidos e Canadá, usadas para calibração do equipamento Somacount 500

CCS/ml	Baixa	Média	Média alta*	Alta
Padrão EUA	149.000	405.000	714.000	1.115.000
Padrão Canadá	104.000	443.000	-	941.000

\* O laboratório canadense não fornece amostra padrão nesta categoria.

Tabela 2. Média e desvio-padrão da contagem de células somáticas (CCS) de leite das amostras padrão segundo a origem

Origem	Média + DP (log cel/ml)
Padrão EUA	5,50±0,47
Padrão Canadá	5,17±0,23

DP= desvio-padrão.

Conforme Babak e Rysanek (1999), a contagem de células somáticas feita por microscopia direta apresenta valores mais altos quando comparados aos valores obtidos em contadores eletrônicos. Essa diferença não ocorreu neste experimento.

As contagens não foram diferentes ( $P>0,05$ ) e a correlação entre os dois métodos ( $r=0,41$ ) foi positiva. Nas análises individuais de leite o desvio-padrão de CCS foi alto (Tab. 3). Os resultados podem ser influenciados pelo procedimento de coleta. Amostras com alta concentração de gordura podem apresentar contagem de células somáticas muito elevadas e vice-versa.

Os valores da CCS não seguem uma curva normal, assim, eles foram convertidos em logaritmo. A estatística descritiva é apresentada nas Tab. 3 e 4.

Tabela 3. Contagem de células somáticas de amostras individuais de leite de vacas

Método de análise	Média±DP	Mínimo	Máximo
Referência (CCS/ml)	353.000±389.000	26.300	2.290.000
Contador eletrônico (CCS/ml)	328.000±377.000	5.800	1.690.000
Referência (log CCS/ml)	5,55±5,59	4,42	6,36
Contador eletrônico (log CCS/ml)	5,52±5,57	3,76	6,23

DP= desvio-padrão.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os métodos de análise.

### Comparação entre o método de referência...

Tabela 4. Contagem de células somáticas de amostras de leite do tanque de resfriamento

Método de análise	Média±DP	Mínimo	Máximo
Referência (CCS/ml)	382.000±198.000	123.000	602.000
Contador eletrônico (CCS/ml)	329.000±32.000	275.000	363.000
Referência (log CCS/ml)	5,58±5,30	5,09	5,78
Contador eletrônico (log CCS/ml)	5,52±4,50	5,44	5,56

DP= desvio-padrão.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os métodos de análise.

Segundo Little (1938), citado por Kitchen (1981), o leite de vacas sadias CCS em torno de 50.000 cel/ml, sendo a contagem até 100.000 cel/ml aceita como normal. Smith (1996) e Brito e Brito (1998) consideram como limite aceitável 200.000 cel/ml, e 300.000 cel/ml são, geralmente, consideradas indicativo da presença de inflamação da glândula mamária. Os valores médios da CCS foram superiores aos aceitos como normais por alguns pesquisadores, porém atendem aos padrões recomendados pela Instrução Normativa N° 051/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que propôs média de 1.000.000 cel/ml, na primeira fase de implantação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (Brasil, 2002).

Muito tem se discutido sobre os padrões de CCS e sua importância para assegurar a higiene e qualidade do leite. Segundo Godkin (2000), ainda não existe regulamentação para a CCS do leite no comércio internacional, entretanto alguns países já adotaram limites máximos de CCS como parte do padrão nacional de regulamentação. No Canadá e nos Estados Unidos os padrões são de, respectivamente, 500.000 cel/ml e 750.000 cel/ml. Na União Européia é de 400.000 cel/ml (Philpot, 1998). No Brasil, em razão das grandes diferenças regionais, para a implantação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite foram estabelecidos, inicialmente, padrões acima dos limites aceitáveis pelos países acima citados.

### CONCLUSÕES

Não houve diferença na CCS entre os métodos de análises, assim os contadores eletrônicos podem ser utilizados para a análise do leite com segurança. As amostras-padrão de origem americana e canadense não diferiam entre si, assim, ambas podem ser utilizadas para a calibração dos contadores eletrônicos.

### AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de controle leiteiro da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba/PR.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN Public Health Association (APHA). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16.ed. Washington: APHA, 1992. 546p.
- BABAK, V.; RYSANEK, D. Inter-laboratory trials milk cell counts: comparison of the Fossomatic and Somacount systems. *Milchwissenschaft*, v.54, p.126-128, 1999.
- BENTLEY Instruments, Inc. *Bentley 2000. Operator's manual*. Minnesota, 1994.
- BRASIL. Instrução Normativa n° 51 de 18 set. 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 set. 2002.
- BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Descomplicando as células somáticas. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. *A qualidade do leite*. Juiz de Fora: EMBRAPA, 1998. P.75-82
- CECALAIT (Centre d'études et de contrôle des analyses en industrie laitière). *La lettre de CECALAIT*, n.7, 1993.
- CHRISTEN, G.L. Analyses. In: HUY, Y.H. *Dairy science and technology handbook*. New York: VCH Publishers, 1993. V.1, p.83-156.
- GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 2., 2000, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 2000. P.9-16.
- HARMON, R.J. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998. P.7-15.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Standards 148. Milk. *Enumeration of somatic cells*. Brussels: IDF, 1991.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, v.48, p.167-188, 1981.

KITCHEN, B.J.; MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Austr. J. Dairy Technol.*, v.39, p.7-16, 1984.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998. P.28-35.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. *Mastitis: counter attack*. Naperville: Babson Bros. Co., 1991. 150p.

RIBAS, N.P. Valor e uso da contagem de células somáticas no manejo de rebanhos leiteiros. In: CONGRESSO HOLSTEIN DE LAS AMERICAS, 6., 2001, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Embrapa Gado de Leite, 2001. P.47-61.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SMITH, K.L. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. *Mastitis Newsletter*, v.21, p.7-9, 1996.