

## COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM LEITE CRU POR QUATRO MÉTODOS DE COLORAÇÃO

[Comparison of somatic cell count in raw milk by four staining methods]

Kelvinson Fernandes Viana<sup>1,\*</sup>, Briza Ferreira Setubal<sup>2</sup>, Vivian Araújo Mendes<sup>2</sup>, Pricila Aparecida Grasse Pietralonga<sup>2</sup>, Marcos Santos Zanini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Discente do Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

<sup>2</sup>Acadêmicos de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo.

<sup>3</sup>Professor. Doutor. Adjunto IV Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo.

**RESUMO** - A contagem de células somáticas (CCS) determina a quantidade de leucócitos e células epiteliais presentes no leite. Em caso de inflamação (mastite subclínica ou clínica), há um aumento considerável na CCS, principalmente de neutrófilos. É importante quantificar e qualificar os tipos celulares presentes para conhecer o grau de inflamação e caracterizar como aguda ou crônica. O objetivo deste trabalho foi testar quatro métodos de coloração de células somáticas; broadhurst-Paley, hematoxilina-eosina, corante Panótico® e May Grunwald-Giemsa por meio da microscopia óptica e determinar a mais adequada para nossas condições de laboratório. Diante dos dados obtidos, elegeu-se a coloração de associação de eosina e azul de metileno (May Grunwald-Giemsa) com a qual se obteve resultados variando entre 60.000 e 58.690.000 células/mL em diferentes amostras de leite bovino. Não foi possível quantificar as células pelos outros três métodos de coloração devido às alterações morfológicas exacerbadas das mesmas.

**Palavras-Chave:** Células somáticas, coloração, leite.

**ABSTRACT** - The somatic cell count (SCC) determines the amount of leukocytes and epithelial cells present in milk. In case of inflammation (subclinical or clinical), there is a considerable increase in SCC, especially neutrophils. It is important to quantify and qualify the cell types present to know the degree of inflammation and characterized as acute or chronic. The objective was to test four staining methods of somatic cells; Broadhurst-Paley, hematoxylin-eosin stain Panoptic and May Grunwald-Giemsa by light microscopy and determine the most suitable for our laboratory conditions. Considering the available data, was elected the association of eosin staining and methylene blue (May-Grunwald Giemsa) with which they obtained results ranging from 60,000 to 58,690,000 cells / ml in different samples of bovine milk. It was not possible to quantify the cells by the other three staining methods due to morphological changes exacerbated them.

**Keywords:** Somatic cell, color, milk.

### INTRODUÇÃO

A mastite constitui um dos maiores entraves à exploração leiteira, não somente pelas perdas econômicas provocadas pela redução da produção e alteração dos principais componentes, como também pela diminuição da vida produtiva dos animais, conseqüente ao comprometimento dos quartos mamários (Domingues et al., 1999).

As células somáticas no leite são constituídas por células de defesa e epiteliais, sendo desta forma um parâmetro para monitorar a qualidade do leite

quando da ocorrência de mastites. As células de defesa são os leucócitos, células que migram para o úbere quando este sofre alguma agressão, como por exemplo, nos casos de infecções. Os leucócitos fagocitam e digerem os microorganismos invasores. Do total de células somáticas, 75 a 98% são correspondentes a células de defesa e 2 a 25%, de células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (Ribas, 1994).

A coloração de células somáticas (CCS) pode ser realizada utilizando-se metodologia indireta, como o

\* Autor para correspondência. E-mail: kelvinsonviana@yahoo.com.br.

CMT (Califórnia Mastite Teste) e direta, quer seja por contagem microscópica ou contagem eletrônica. A contagem de células somáticas (CCS) trata-se de um excelente indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite. A análise de leite do tanque é uma ferramenta útil para avaliar a qualidade do leite e monitorar a saúde da glândula mamária em nível de rebanho, além de ser utilizada como parâmetro para pagamento do leite (Santos, 2005).

No Brasil, a coloração e contagem automática direta de células somáticas do leite são realizadas preferencialmente por duas marcas de equipamentos, Somacount (Bentley Instruments Incorporated, Minnesota, EUA) e o Fossomatic (Foss Electric, Dinamarca). Estes aparelhos funcionam genericamente sob o princípio de citometria de fluxo, que consiste na contagem microscópica dos núcleos corados de células isoladas e deslocados em frente da objetiva do microscópio por um líquido de escoamento laminar (Cecalait, 1993). Para realização da contagem microscópica manual há possibilidade da utilização de diversos protocolos de coloração, sendo clássico o método descrito por Prescott & Breed (1910) que é bastante trabalhoso quando de um maior número de amostras. Outras colorações são sugeridas utilizando o método modificado de Prescott e Breed: Broadhurst-Paley (Santos & Vilela, 1983), May Grunwald-Giemsa (Morgante et al., 1996), Hematoxilina-eosina (Benites et al., 2001) e o Panótico®, corante a base de eosina e azul de metileno.

A International Dairy Federation (1981) estabeleceu 500.000 células somáticas (cel/mL) no leite como limite máximo para leite normal, passando este a ser um referencial máximo para países que queiram ingressar no mercado internacional de exportação de leite. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento alterou a legislação sobre a produção de leite através da Normativa nº 51. A adaptação dos produtores a essa nova lei será gradual, com valor máximo inicial de CCS em 1.000.000 células/mL, sendo previsto um decréscimo de 400.000 células/mL após 7 anos da entrada em vigor dessa legislação (Santos, 2002).

O presente estudo teve por objetivo, avaliar a coloração de células somáticas através de quatro métodos de coloração, sendo eles, Broadhurst-Paley, May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-eosina e Panótico®. Além disso, realizar a contagem diferencial entre células epiteliais, polimorfonucleares e mononucleares de leite submetido ao CMT (California Mastite Test) com resultado positivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite foram coletadas em 13 propriedades rurais, totalizando um rebanho de 306 animais, 1224 tetos examinados, com CMT positivo para 151 tetos classificados como mastite subclínica em 117 vacas do entorno da região do Caparaó, sul do Estado do Espírito Santo.

Antecedendo as atividades dos protocolos de coloração, fez-se necessária a preparação dos materiais que seriam utilizados para a condução do experimento, tais como os corantes citados abaixo, além da alteração da área da lâmina onde o leite seria distribuído para coloração e posterior leitura por microscopia óptica, visto que, segundo Prescott & Breed (1910) os padrões de área descritos seriam de 10 mm / 10 mm, no entanto optou-se pelas proporções de 50 mm / 2 mm, mantendo-se assim a área de 1 cm<sup>2</sup>.

Após a assepsia de cada teto, as amostras de leite foram coletadas para a realização do teste CMT. Neste contexto, somente as amostras positivas ao teste foram selecionadas. Todo o material foi acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhado para análise ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo.

Após o processamento das amostras, as mesmas foram submetidas a quatro tipos de coloração, sendo elas, Broadhurst-Paley, indicado por Santos & Vilela (1983), coloração com hematoxilina-eosina (Benites et al., 2001), corante Panótico® (Laborclin Pinhais – Paraná) e coloração May Grunwald-Giemsa e outras associações básicas de eosina e azul de metileno citadas por Morgante et al. (1996), Dulin et al. (1982) e Rosenfeld . (1947).

Como padrão ouro, foi implantado o método descrito por Prescott & Breed (1910) modificado, onde após a fixação e coloração do leite, contou-se 100 campos microscópicos ao longo da lâmina, diferenciando as células entre polimorfonucleares (neutrófilos principalmente) e mononucleares (linfócitos e monócitos). Então se multiplicou o total de células encontradas por 5000 e pelo fator de diluição.

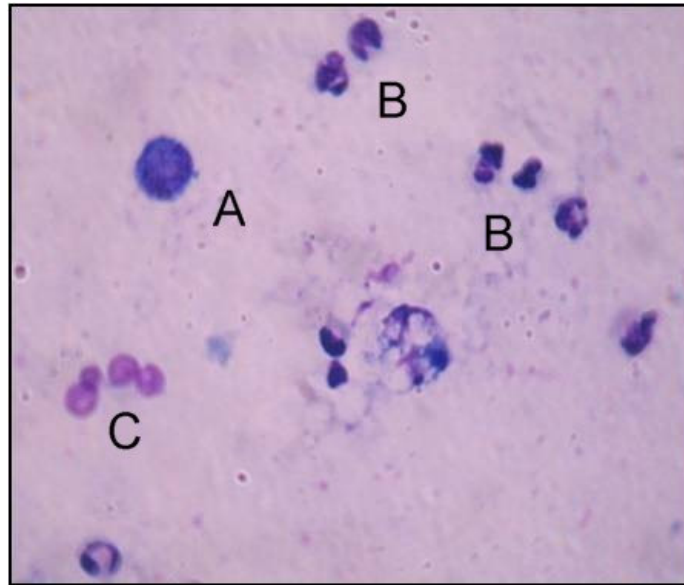
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os métodos testados, a coloração de May Grunwald-Giemsa apresentou os melhores resultados quanto à visualização de morfologia e contagem celular nas condições de nosso laboratório (Figura

1), pois as demais colorações, devido às diversas etapas de lavagem e fixação, sempre resultaram em contagens extremamente inferiores, além de apresentarem alterações morfológicas exacerbadas de células quando comparados à coloração de May Grunwald-Giemsa. Com base na contagem diferencial das lâminas, observaram-se algumas amostras dentro do padrão indicado pela International Dairy Federation (1981) e um elevado número de amostras que ultrapassaram o limite de 500.000 células/mL. Em um total de 79 amostras de leite, foram encontrados 58.480.000 polimorfonucleares e 1.260.000 mononucleares, totalizando 59.740.000 células (Tabela 1).

A alteração da área de contagem da lâmina (onde seria distribuído o leite) de 10 mm por 10 mm descrita por Prescott & Breed (1910) para 50 mm por 2 mm, mantendo-se assim a área de 1 cm<sup>2</sup>, melhorou o manuseio da lâmina no microscópio, assim como a diluição do leite em salina (não citada em outros trabalhos, mas realizada por nós) facilitou, pois muitas amostras possuíam número excessivo de células que inviabilizam a contagem devido à sobreposição de células.

Observou-se que ao refrigerar o leite, a morfologia celular foi alterada dificultando a diferenciação entre MN e PMN, sendo necessária à realização da tarefa



**Figura 1.** Esfregaço de leite corado com Coloração May Grunwald-Giemsa, mostrando linfócitos (A) neutrófilos (B) e células epiteliais de descamação (C).

**Tabela 1.** Resultados obtidos da contagem de 79 amostras, coradas com May Grunwald-Giemsa, referentes aos valores mínimos, médios e máximos de polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e total de células/mL.

	PMN	MN	Total
mínimo	50.000	10.000	60.000
médio	2.337.531	210.443	2.547.974
máximo	58.480.000	1.260.000	59.740.000

no mesmo dia da coleta. A não diluição das amostras também prejudicou o experimento, já que as células revelaram-se sobrepostas.

Os métodos de Broadhurst-Paley e Panótico® revelaram-se inadequados para o leite bovino, já que apresentaram grande quantidade de gordura e ainda não possibilitaram a diferenciação entre polimorfonucleares (PMN) e monócitos (MN). A coloração hematoxilina-eosina não demonstrou praticidade e agilidade, o que tornou inviável a sua utilização.

Quando comparado às demais colorações, o corante May Grunwald-Giemsa mostrou-se superior, pois além de prático, evidenciou a morfologia celular e a distinção de cores entre PMN e MN. Além disso, facilitou observar a coloração específica das estruturas de diferentes tipos celulares, facilitando a diferenciação. Deste modo, os linfócitos apresentaram núcleo azul-violeta e citoplasma azul, os monócitos núcleo azul-violeta e citoplasma azul, os neutrófilos núcleo azul escuro e citoplasma rosa pálido com granulações de tons róseos a azul claro, os basófilos núcleo púrpura a azul escuro com granulações volumosas cobrindo todo citoplasma azul escuro, os eosinófilos núcleo azul e citoplasma rosa pálido com grânulos volumosos vermelho a vermelho laranja.

A quantidade excessiva de células somáticas encontradas justificou o fato de todas as amostras serem classificadas como CMT positivo, o que prova a presença principalmente de mastite subclínica. A mastite subclínica determina, ainda, mudanças na concentração dos principais componentes do leite, como: proteína, gordura, lactose, minerais e enzimas. Os principais fatores relacionados com a alteração dos componentes do leite são as lesões das células produtoras de leite, que podem resultar em alterações da concentração de lactose, proteína e gordura, e aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas (Steffert, 1993).

A CCS apresenta-se um indicador da saúde da glândula mamária e o desenvolvimento de equipamentos para contagem automática de células somáticas facilitou os estudos relacionados ao manejo e à incidência de mastite na espécie bovina (Philpot, 1986). Gadini et al. (1997) observaram que, como a medida da CCS é mais fácil e mais barata quando comparada com os testes bacteriológicos, esta tem se convertido numa ferramenta importante para o manejo de animais

leiteiros. A CCS serve como um método preventivo por permitir o acompanhamento regular da situação individual dos animais em lactação, levando à diminuição da incidência de mastite nos rebanhos (Ribas, 1994). Allore et al. (1998) indicaram que a contagem feita com amostras individuais é utilizada como medida de saúde do úbere, enquanto que a CCS das amostras do tanque de leite é usada como medida de qualidade.

Alcançar os padrões de contagem de células somáticas estabelecidos pela IN 51 não requer tão somente critérios de inspeção e vigilância, mas de disseminação de uma política de qualidade que envolva todos os participantes do processo. A norma determina padrões, porém, as mudanças em prol da qualidade exigem a consciência da indústria e do produtor. Dessa forma, considera-se que a IN 51 permitirá com sua implantação gradual, que esta consciência, mesmo que de forma imposta legalmente, seja colocada em prática.

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados, concluímos que a coloração de May Grunwald-Giemsa mostrou-se superior quando comparada às demais colorações, apresentando um mínimo e máximo de células totais por mL de 60.000 e 59.740.000 respectivamente. Os métodos Broadhurst-Paley, hematoxilina-eosina e corante Panótico® provocaram significantes alterações morfológicas nas células, acarretando em impossibilitar uma contagem diferencial significativa.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES) pelo incentivo dado à realização deste projeto, assim como os produtores rurais que se dispuseram a contribuir para o andamento do estudo.

## REFERÊNCIAS

- Allore, H. G., Wilson, D. J., Erb, H. N. & Oltenacu, P. A. 1998. Selecting linearscore distributions for modeling milk-culture results. *Prev. Vet. Med.* 3:11-29.
- Benites, N. R., Melville, P.A. & Costa, E.O. 2001. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. *Rev. Napgama* 3:6-9.
- Cecalait. 1993. (Centre D'études et de Contrôle des Analyses en Industrie Laitière) La lettre de Cecalait. Paris, p.33.

- Domingues, P. F., Langoni, H. & Rocha, N. S. 1999. Concentração plasmática de cobre, ferro, zinco, vitamina C e Beta caroteno em vacas com mastite subclínica. In: III Encontro de pesquisadores em mastite FMVZ/UNESP/Botucatu. Anais... p.143.
- Dulin, A.M., Paape, M.J. & Wergin, W.P. 1982. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food. Prot.* 45:435-439.
- Fonseca, L.F.L & Santos, M.V. 2000. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos Editorial. 122p.
- Gadini, C. H., Keown, J. F. & Vleck, L. D. V. 1997. Parâmetros genéticos do escore de células somáticas. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. Anais... Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia. 3:41-43.
- IDF - International Dairy Federation. 1981. The IDF group of experts on mastitis. Laboratory methods for use in mastitis word. *Inter. Dairy Fed.* 132:3-27.
- Morgante, M.; Ranucci, S.; Pauselli, M.; Beghelli, D.; Mencaroni, G. 1996. Total and differential cell count by direct microscopic method on ewe milk. *Zent. Vet. A* 43:451-458.
- Müller, E.E. 2002. Qualidade do leite, Células Somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, Maringá. Anais...UEM. p206-217.
- Philpot, N. W. 1986. Somatic cell counts and your mastitis control program. *Dairy Res. Rep.* 5:48-57.
- Prescot, S.C & Breed, R.S. 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *J. Infec. Dis.* 7:632-640.
- Ribas, N.P. 2004. Análise do Leite. *Revista Gado Holandês* 2:26-31.
- Rosenfeld, G. 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia. Nova combinação dos componentes de May-Grunwall e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. But.* 20:329-335.
- Santos, E.C. & Vilela, M.A.P. 1983. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério da avaliação de qualidade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 35:907-919.
- Santos, M. V. 2005. CCS E CBT siglas fundamentais para avaliar qualidade do leite. *Balde Branco* 490:48-51.
- Santos, M. V. 2002. Efeitos da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa p. 179-188.
- Steffert, I.J. 1993. Compositional changes in cow's milk associated with health problem. In: Milk Fat Flavour Forum, Palmerston North, New Zealand. Proceedings... Palmerston North, New Zealand: New Zealand Dairy Research Institute, p.119-125.