

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E VIABILIDADE CELULAR EM CABRAS COM MASTITE SUBCLÍNICA POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

Sandra Renata Sampaio Salaberry¹
André Becker Simões Saidenberg
Eveline Zuniga
Fernanda Fidelis Gonsales
Priscilla Anne Melville
Nilson Roberti Benites

RESUMO

Pesquisas têm demonstrado que há uma elevação na viabilidade celular quando ocorre aumento na contagem de células somáticas (CCS) em infecções da glândula mamária em animais. O principal micro-organismo isolado em mastite subclínica dos caprinos é *Staphylococcus* spp. Os objetivos do presente estudo foram determinar a CCS, células viáveis e relacioná-las com *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de cabras com mastite subclínica. Foram colhidas três alíquotas de amostras de leite de cabras reagentes ao teste do CMT (California Mastitis Test) para a realização da viabilidade celular, exame microbiológico e CCS. Determinou-se a viabilidade celular, após centrifugações das amostras de leite e visualização das células em microscópio, utilizando o corante azul de *Trypan* e a quantidade de CCS, utilizando equipamento de citometria de fluxo. Das amostras analisadas, 104 não tiveram isolamento de micro-organismos e 110 apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., dos quais os mais frequentemente detectados foram: *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a CCS e a viabilidade celular das amostras nas quais houve isolamento de *Staphylococcus* spp. e as amostras sem crescimento bacteriano, o que demonstrou um aumento da CCS e da viabilidade celular nas amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: azul de *Trypan*, CCS, células viáveis, estafilococos.

SOMATIC CELL COUNT AND CELL VIABILITY IN GOATS WITH SUBCLINICAL MASTITIS BY *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

ABSTRACT

Research has shown that there is an increase in cell viability when a growth in somatic cell count (SCC) in infections of the mammary gland occurs. The main microorganism isolated from subclinical mastitis in goats is *Staphylococcus* spp. The aims of this study were determined SCC, viable cells and relate them with *Staphylococcus* spp. isolated from milk samples of goats with subclinical mastitis. Three aliquots of milk samples from goats reagents to CMT test (California Mastitis Test) were collected for performing cell viability, microbiology and SCC. Cell viability, after centrifugation of milk samples and viewing the cells under a microscope, using Trypan blue dye, and the amount of SCC, through the flow cytometry equipment, were determined. A total of 104 samples had no isolation of microorganisms and 110 showed isolation of *Staphylococcus* spp., of which the most frequently detected were: *S. epidermidis*, *S. intermedius* and *S. lugdunensis*. There was a statistically significant difference between SCC and cell viability of samples in which there

¹ Laboratório de Bacteriologia e Micologia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Contato principal para correspondência.

was isolation of *Staphylococcus* spp. and samples without bacterial growth, that showed an increase in SCC and cell viability in milk samples of goats with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

Keywords: SCC, staphylococci, *Trypan* blue, viable cells.

CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y LA VIABILIDAD CELULAR EN CABRAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

RESUMEN

La investigación ha demostrado que existe un aumento en la viabilidad celular cuando se produce un aumento en el conteo de células somáticas (CCS) en infecciones de la glándula mamaria en animales. El principal microorganismo aislado en la mastitis subclínica en el ganado caprino es *Staphylococcus* spp. Los objetivos de este estudio son determinar el CCS, células viables y relacionar los con *Staphylococcus* spp. aislado de las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica. Se cosecharon três alícuotas de las muestras de leche de cabras reactivas para CMT (California Mastitis Test) para la realización de la viabilidad celular, la microbiología y de CCS. Se determinó la viabilidad de las células después de la centrifugación de las muestras de leche y la visualización de las células bajo un microscópio, utilizando colorante azul de *Trypan*, y la cantidad de CCS a través del equipo de citometría de flujo. De las muestras, 104 no estaban aislando microorganismos y 110 mostraron aislamiento de *Staphylococcus* spp., de los cuales el detectado con mayor frecuencia fueron: *S. epidermidis*, *S. intermedius* y *S. lugdunensis*. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el CCS y la viabilidad celular de las muestras en las que no había aislamiento de *Staphylococcus* spp. y muestras sin crecimiento bacteriano, que mostraron un aumento en CCS y la viabilidad celular en las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica causada por *Staphylococcus* spp.

Palabras clave: azul *Trypan*, CCS, células viables, estafilococos.

INTRODUÇÃO

A infecção intramamária interfere na contagem de células somáticas (CCS) do leite de animais. Quando os micro-organismos invadem a glândula mamária e começam a se multiplicar, ou quando o número de micro-organismos aumenta significativamente em uma glândula já infectada, o organismo direciona os leucócitos do sangue para a região afetada, com intuito de combater a agressão tecidual. Tal fato, conseqüentemente, aumenta a quantidade de células somáticas no leite (1). Em caprinos leiteiros, um dos principais micro-organismos envolvidos na mastite subclínica é *Staphylococcus* spp. que causa aumento da CCS no leite (2,3).

A viabilidade celular é reconhecida como o percentual de células disponíveis para manifestação de suas atividades e quanto maior o número de células somáticas na amostra de leite, maior a concentração de células viáveis (4). Assim, durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular (5).

Estudo realizado com vacas de leite verificou que as células do leite são menos viáveis e possuem menor capacidade de responder a estímulos imunológicos do que as células que são recrutadas e que migram do sangue para o leite. Assim, as células que já estavam presentes no leite são menos efetivas na resposta imunológica e a melhor proteção da glândula mamária

contra a infecção é o rápido recrutamento de novas células de defesa do sangue, causando aumento na CCS (6).

Tendo em vista a escassez de pesquisas sobre a viabilidade celular na mastite subclínica caprina, os objetivos do presente estudo foram determinar a contagem de células somáticas e células viáveis e relacioná-las com os *Staphylococcus* spp, isolados de amostras de leite de cabras com mastite subclínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas cabras que estavam entre o terceiro e sétimo mês de lactação. Realizou-se exame físico da glândula mamária com inspeção e palpação do úbere e tetos, identificando a presença ou não de sinais de inflamação (7).

Para identificar os animais com mastite clínica efetuou-se o teste da caneca de fundo preto segundo Santos e Fonseca (8). A identificação da mastite subclínica foi realizada pelo teste de CMT (California Mastitis Test) segundo metodologia estabelecida por Schalm et al. (9). As glândulas mamárias que apresentaram alterações nesse teste (1+, 2+ ou 3+) foram classificadas como casos de mastite subclínica. Em seguida, foram colhidas amostras de leite individuais de cada glândula reagente no CMT.

As amostras de leite foram colhidas em três alíquotas: a primeira para a avaliação da viabilidade celular, em tubos Falcon, contendo 25 mL de tampão fosfato salina (PBS) e completados com mais 25 mL de leite. A segunda amostra visou o exame microbiológico, colhidas em tubos estéreis. A terceira amostra foi para a contagem de células somáticas (CCS), colhendo 40 mL de leite em frascos contendo o conservante bronopol. A colheita das amostras de leite foi realizada assepticamente, utilizando álcool iodado 2% para a higienização das estruturas mamárias. O transporte das amostras para o laboratório foi realizado em temperatura de refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

Os tubos Falcon com 25 mL de leite e 25 mL de PBS foram submetidos à centrifugação de 1000 g, durante 15 minutos à temperatura de 4°C, de acordo com Koess e Hamann (10). Após, retirou-se o sobrenadante e o botão formado foi desprendido e ressuscitado em 1 mL de PBS e transferido para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, outra centrifugação de 400 g foi realizada, por 10 minutos a mesma temperatura. Ao término da segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o botão novamente foi ressuscitado em PBS. Uma terceira centrifugação foi realizada, semelhante à segunda.

Para a leitura da viabilidade celular, adicionou-se em um microtubo de 1,5 mL, 10 µL da suspensão celular e 90 µL de azul de *Trypan* (Merck, Alemanha) 0,4% e, em seguida, 10 µL desta suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem celular no microscópio. Foram contadas 100 células por amostra de leite para que o valor da contagem da viabilidade celular fosse convertido em percentual. Para calcular o número de células viáveis, foi verificado o número de CCS de cada amostra e aplicado o percentual da viabilidade celular, obtendo-se o número de células viáveis.

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%) e incubadas a 37°C por 72 horas (11), sendo realizada a leitura das placas em 24, 48 e 72 horas de incubação. A identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada com base em provas bioquímicas (12), seguida da classificação estabelecida por Murray et al. (13). Foram selecionadas as amostras de leite que apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., bem como as que não apresentaram isolamento bacteriano, que foram consideradas como controle negativo.

Para a contagem de células somáticas, utilizou-se citometria de fluxo no equipamento Fossomatic (Foss, Dinamarca), de acordo com a International Dairy Federation (14).

A análise estatística utilizada para comparar a CCS e células viáveis com a presença ou ausência de *Staphylococcus* spp., SCN e SCP e espécies de estafilococos foi o teste de Mann-Whitney, utilizando o programa InStat (Graphpad, EUA) e adotando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Das amostras analisadas, 104 não tiveram isolamento de micro-organismos e 110 apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., dos quais 90 foram estafilococos coagulase negativa (SCN) e 20 estafilococos coagulase positiva (SCP). Houve maior ocorrência das seguintes espécies de estafilococos: 27 (24,5%) *S. epidermidis*, 17 (15,4%) *S. lugdunensis* e 15 (13,6%) *S. intermedius*.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a CCS das amostras nas quais houve isolamento de *Staphylococcus* spp. e as amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 1). Assim, animais com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* spp. apresentaram CCS maior ($p < 0,05$) do que os animais que não tiveram isolamento de micro-organismo em amostras de leite. As medianas da viabilidade celular para as amostras de leite com e sem isolamento de *Staphylococcus* spp. foram, respectivamente, 87,28% (valor máximo: 98,63 e valor mínimo: 55,56) e 85,15% (valor máximo: 98,67 e valor mínimo: 40,00), tendo sido observada diferença estatística significativa entre estes valores ($p < 0,05$). Ao realizar o cálculo das células viáveis, também foi observada diferença estatística significativa, demonstrando maior quantidade de células viáveis nas amostras que tiveram isolamento de *Staphylococcus* spp.

Tabela 1. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis obtidas em relação às amostras com e sem isolamento de estafilococos do leite de cabras - São Paulo – 2014.

Resultado microbiológico	CCS ($\times 10^3$)			Células viáveis ($\times 10^3$)		
	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
<i>Staphylococcus</i> spp.	1763,5 ^a	9999	171	1549,2 ^a	9499,1	142,5
Sem isolamento bacteriano	996 ^b	9999	88	816,7 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$)

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a CCS e células viáveis das amostras com isolados de SCN e SCP. No entanto, ao comparar SCN e SCP com as amostras de leite sem isolamento bacteriano, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Esses resultados demonstraram que, embora não tenha sido diferente a CCS e células viáveis dos caprinos que apresentaram mastite subclínica por SCN e SCP, os valores de CCS e células viáveis apresentaram-se mais elevados em relação às amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 2).

Tabela 2. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis em relação às amostras de leite de cabras sem e com isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva. São Paulo – 2014.

Resultado microbiológico	CCS (x 10 ³)			Células viáveis (x 10 ³)		
	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
SCN	1695 ^a	9999	204	1450,9 ^a	8717,2	142,8
SCP	3201 ^a	9999	171	2750,4 ^a	9499,1	142,5
Sem isolamento bacteriano	996 ^b	9999	88	816,7 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

SCN - *Staphylococcus*coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus*coagulase positiva

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

Não houve diferença estatística significativa entre os valores de CCS e células viáveis dos micro-organismos *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* (p>0,05), embora *S. intermedius* tenha apresentado o valor de mediana da CCS e células viáveis mais elevados do que *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. Foi observada diferença estatística significativa ao associar a CCS e células viáveis das amostras sem isolamento bacteriano com *S. epidermidis* e *S. intermedius* (p<0,05), os quais apresentaram maior valor de CCS e células viáveis em relação às amostras sem isolamento bacteriano. Em contraste, as estirpes de *S. lugdunensis* não apresentaram diferença estatística significativa ao associá-la com as amostras sem isolamento bacteriano (p>0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis em relação às amostras de leite de cabra sem e com isolamento de espécies de estafilococos. São Paulo – 2014.

Espécies	n	CCS			Células viáveis		
		Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
<i>S. epidermidis</i>	27	2157 ^a	9999	204	1776,3 ^a	8312,2	142,8
<i>S. intermedius</i>	17	2966 ^a	9999	171	2522,9 ^a	9499,1	142,5
<i>S. lugdunensis</i>	15	1608	7807	204	1361,7	7122,3	167,9
Sem isolamento bacteriano	104	996 ^b	9999	88	816,6 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

DISCUSSÃO

Estudos com caprinos demonstraram que a CCS é maior em glândulas mamárias infectadas do que nas hígdas (3,15,16), conforme também foi detectado no presente estudo. Luengo et al. (17), ao avaliarem 1.304 cabras com o objetivo de identificar fatores que afetam a CCS em infecções intramamárias, verificaram que cabras sem infecção bacteriana apresentaram CCS menor do que as cabras com infecção na glândula mamária por “patógenos menores” (SCN, *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp.) e “patógenos maiores” (*Staphylococcus aureus*, enterobactéria, não-enterobactérias, *Streptococcus* spp. e *Mycoplasma* spp.). Uma pesquisa realizada com 25 animais em Israel, em que todas as cabras apresentavam uma glândula mamária infectada naturalmente por *Staphylococcus* spp. e a outra, sem isolamento de micro-organismo, demonstrou que as glândulas mamárias infectadas tiveram maior CCS em relação às glândulas mamárias sem isolamento bacteriano (18).

Não houve diferença na mediana da CCS das glândulas mamárias com isolamento de SCP ($3.201 \times 10^3/\text{mL}$) e SCN ($1.695 \times 10^3/\text{mL}$) devido à distribuição das células serem heterogêneas, o que pode ser observado pelos valores máximo e mínimo de SCP e SCN. Em contrapartida, outros estudos detectaram maior quantidade de CCS nos SCP do que SCN (3,15,17,19). Os SCN podem desenvolver mastites subclínicas persistentes, as quais também estão relacionadas a aumentos significativos da CCS e podem apresentar variações nos níveis da CCS entre 300×10^3 e 1.600×10^3 células/mL (16,18). Em contraste, no presente estudo, os valores mínimo e máximo de CCS para os SCN variaram, respectivamente, de 204×10^3 a 9999×10^3 de células/mL.

Também se verificou que os SCN e os SCP apresentaram maior quantidade de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, demonstrando que a presença de micro-organismos interfere diretamente na CCS, concordando com os resultados encontrados por outros autores (3,16,17,19).

Nesse estudo, não foi observada diferença nos valores de CCS das espécies de estafilococos mais detectadas (*S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*), coincidindo com Moroni et al. (20), que também não encontraram diferença da CCS entre *S. epidermidis* e outros SCN.

S. epidermidis e *S. intermedius* apresentaram maior número de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, fato que não ocorreu para *S. lugdunensis*. Diferentemente disso, Deinhofer e Pernthaner (21) encontraram elevado valor de CCS para *S. lugdunensis* isolados de cabras com mastite clínica e tal diferença para o presente estudo pode ser justificada pelo uso somente de cabras com mastite subclínica.

A diferença nos valores de CCS de uma infecção na glândula mamária por SCN em pequenos ruminantes e em bovinos é que nos bovinos o aumento da CCS é leve ou moderado e nos caprinos o aumento da CCS é elevado, sugerindo que a glândula de pequenos ruminantes tenha aumento na resposta imunológica contra o SCN (22,23), o que pode justificar o aumento de CCS nos isolados de *S. epidermidis*. Leitner et al. (19), ao realizarem pesquisa em 103 cabras para avaliar a imunidade da glândula mamária com infecção por espécies de estafilococos, constataram que as espécies de SCN (*S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*) apresentaram elevados valores de CCS ao comparar com as cabras que não tinham infecção na glândula mamária. Neste estudo, também foram encontrados elevados valores de CCS para SCN em relação às amostras sem isolamento bacteriano.

Pesquisas sobre *S. intermedius* e a variação da CCS são escassas. Em contrapartida, muitas informações estão disponíveis na literatura sobre *S. aureus*, que também é SCP, e é responsável por causar elevado aumento na CCS de caprinos com infecção intramamária (15,17,19,22,24). Bagnicka et al. (25) classificaram as bactérias responsáveis por causar infecção intramamária caprina em grupos de “patógenos menores e maiores”, sendo que no

primeiro grupo estavam inclusos *S. aureus* e *S. intermedius* e, no segundo, SCN. Foi observado elevado aumento da CCS no grupo de patógenos maiores e menores em relação ao grupo sem infecção intramamária, conforme também foi constatado no presente trabalho, que os valores de CCS para SCN e SCP foram mais elevados do que nas amostras sem isolamento bacteriano e, além disso, não houve diferença entre a CCS de SCN e SCP.

A quantidade de células viáveis foi maior nas amostras de leite que tiveram isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano. Os resultados observados corroboram com os achados de Mehrzad et al. (26), que durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular, o que justifica maior viabilidade celular nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano.

Outras pesquisas encontraram resultados semelhantes ao detectado neste estudo. Neste contexto, Piccinini et al. (27) avaliaram a viabilidade celular em 80 vacas e encontraram uma média de viabilidade maior no grupo de animais que apresentavam mastite subclínica por *S. aureus* ($59,69 \pm 19,60\%$) do que no grupo sem isolamento bacteriano ($49,79 \pm 19,21\%$).

Merle et al. (28) avaliaram a viabilidade celular no leite de vacas com e sem mastite e observaram viabilidade celular maior (84%) no grupo de animais com mastite severa - animais que apresentavam CCS maior que 400.000 células/mL - do que nos animais hígidos (72,6%) - com CCS menor que 100.000 células/mL. No mesmo estudo, porém, não foi avaliado o tipo de micro-organismo isolado, tendo sido considerado apenas o valor da CCS para divisão dos grupos, diferindo do presente estudo, no qual a separação dos grupos foi de acordo com a presença de *Staphylococcus* spp. e sem isolamento bacteriano.

Boulaaba et al. (29) analisaram a quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis por citometria de fluxo em amostras de leite de 25 cabras e detectaram que a média da quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis em amostras com isolamento de SCN ($73,2 \pm 12,6\%$) foi maior do que nas amostras sem isolamento bacteriano ($65,4 \pm 13,6\%$). Neste estudo, foi verificada diferença entre as amostras de leite de SCN e SCP em relação às sem isolamento bacteriano, embora a metodologia para avaliação das células viáveis empregada por Boulaaba et al. (29) tenha sido diferente.

Vale ressaltar que o percentual de viabilidade celular encontrado no presente estudo, 87,28% e 85,15% nas amostras com e sem isolamento bacteriano, respectivamente, foi maior do que os resultados encontrados por estudos similares (27,28,29). Tal achado pode ser justificado por diferentes metodologias e espécies animais utilizadas, o que torna difícil a comparação entre os experimentos existentes sobre viabilidade celular.

Foi observado que os achados encontrados para as células viáveis foram coincidentes com os da CCS, o que pode sugerir que os resultados das células viáveis podem ter sido influenciados pela CCS, já que o cálculo das células viáveis foi baseado na CCS. Entretanto, o percentual da viabilidade celular apresentou-se mais elevado nas amostras com isolamento bacteriano, concordando com resultados já apresentados por outros autores, que a viabilidade celular pode ser maior quando há aumento no número de CCS na glândula mamária (30). Portanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar o papel das células viáveis na avaliação da saúde da glândula mamária.

CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se aumento da CCS e da viabilidade celular nas amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp., sugerindo que as células inflamatórias que são recrutadas e que migram do sangue para o leite podem apresentar maior efetividade na resposta inflamatória mamária.

REFERÊNCIAS

1. Pales AP, Santos KJG, Figueiras EA, Melo CS. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. Rev Eletron Facul Montes Belos. 2005;1:162-73.
2. Bergonier D, Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res. 2003;34:689-716.
3. Moroni P, Pisoni G, Ruffo G, Boettcher PJ. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cells counts in Italian dairy goats. Prev Vet Med. 2005b; 69:163-73.
4. Della Libera AMMP, Birgel EH, Mori E, Kitamura SS, Mirandola RMS, Araujo WP. Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígidas, sem elicitação, criadas no estado de São Paulo. Rev Bras Cienc Vet. 2005;12:114-7.
5. Paape MJ, Capuco AV. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. J Anim Sci. 1997;75:556-65.
6. Baumert A, Bruckmaier RM, Wellnitz O. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. J Dairy Res. 2009;76:356-64.
7. Pugh DG. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca; 2004.
8. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole; 2007.
9. Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea e Febiger; 1971.
10. Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. J Dairy Res. 2008;75:225-32.
11. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493-6.
12. Lennette EM, Balows A, Hansler JRWJ. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington: American Society of Microbiology; 1985.
13. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: Asm Press; 2007.
14. International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cells - Part 2: guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Geneva: ISO and IDF; 2006.
15. Haenlein GFW. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. Small Rumin Res. 2002;45:163-78.

16. Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, Crémoux R, Gonzalo C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Rumin Res.* 2007;68:126-44.
17. Luengo C, Sánchez A, Corrales JC, Fernández C, Contreras A. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *J Dairy Res.* 2004;71:169-74.
18. Leitner G, Merin U, Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci.* 2004; 87:1719-26.
19. Leitner G, Sapeiro S, Krifucks L, Weisblit L, Lavi Y, Heller ED. Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various *Staphylococcus* species. *Small Rumin Res.* 2011;95:160-7.
20. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, et al. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J Dairy Sci.* 2005a;88:1694-704.
21. Deinhofer M, Pernthaner A. *Staphylococcus* spp. as mastitis – related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol.* 1995;43:161-6.
22. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007;68:145-53.
23. Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. Somatic cell count in small ruminants: friend or foe? *Small Rumin Res.* 2012;107:65-75.
24. Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci.* 2003;79:273-83.
25. Bagnicka E, Winnickab A, Józwick A, Rzewuska M, Strzałkowska N, Kosciuczu E et al. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. *Small Rumin Res.* 2011;100:72-7.
26. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 2004;87:4150-62.
27. Piccinini R, Bronzo V, Moroni P, Luzzago C, Zecconi A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Res.* 1999;66:501-10.
28. Merle R, Schroder A, Hamann J. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *J Dairy Res.* 2007;74:174-9.
29. Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Rumin Res.* 2011;97:117-23.

30. Blagitz MG, Souza FN, Gomes V, Della Libera AMMP. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. *Small Rumin Res.* 2011;100:67-71.

Recebido em: 14/07/2014

Aceito em: 25/06/2015