

Contagem diferencial de células no leite de vacas com mastite subclínica com as colorações de May-Grünwald Giemsa e Gram*

Ana Paula Lopes Marques^{1*}, Rita de Cássia Campbell Machado Botteon¹, Carlos Henrique Machado¹, Bianca Pachiel Medeiros², Jessica D'ávila de Assis², Janne Paula Neres Barros³ e Fernanda Leite Araújo³

ABSTRACT. Marques A.P.L., Botteon R.C.C.M., Machado C.H., Medeiros B.P., Assis J.D., Barros J.P.N. & Araújo F.L. [**Differential count of cells in the milk of cows with subclinical mastitis with the colorations of May-Grünwald Giemsa and Gram.**] Contagem diferencial de células no leite de vacas com mastite subclínica com as colorações de May-Grünwald Giemsa e Gram. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.2):123-127, 2016. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: marquesapl@ufrj.br

Somatic cell count (SCC) determines the amount of leucocytes and epithelial cells present in milk. It is used for monitoring the subclinical mastitis in the herd. Various tests can be used for SCC. For convenience and accuracy there is the electronic counting by flow cytometry. Microscopic slides count is the standard method for the determination of SCC in raw milk with the classic method described by Prescott and Breed (1910). This study aimed to evaluate the differential cell count in milk of cows with subclinical mastitis, by optical microscopy, in slides stained by May Grünwald-Giemsa and Gram. In both staining the cells showed morphological changes. However, the unidentifiable cell percentage did not exceed 10% enhancing the applicability of the differential cell counts, as used in leucocytes in hematologic smears. There were small variations in the counts with the two colorations. There was a predominance of neutrophils (>60%), followed by lymphocytes (>25%) consistent with the characterization of the samples as coming from rooms with subclinical mastitis. May Grünwald-Giemsa stain showed similar results to Gram. The main differences between the colorations are based on the amplitude and intensity of staining, the Gram stain which stood out. In Gram staining of cytological entire background and other elements were evidenced. The Gram had the advantage of circular voids view corresponding to fat, enabling setting on the presence of neutrophils in milk for a long time, in some samples and identification of bacteria was easily accomplished. It is concluded that the viability staining Gram alternatively, and further is used as a complementary color, which would increase the representation of counts and the ability of observations of other elements in the sample.

KEY WORDS. Staining, cytology, milk, somatic cells.

* Recebido em 21 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 18 de outubro de 2016.

¹ Médico-veterinário, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: ritabotteon@gmail.com; cahema2@gmail.com; *Autora para correspondência, E-mail: marquesapl@ufrj.br

² Graduação, Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: jdarural@gmail.com; fernandaaraujovet@gmail.com

³ Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: janepaula_7@hotmail.com; biapachiel@hotmail.com

RESUMO. A contagem de células somáticas (CCS) determina a quantidade de leucócitos e células epiteliais presentes no leite. É utilizada para o monitoramento dos índices de mastite subclínica no rebanho. Vários testes podem ser usados para a CCS. Pela praticidade e precisão destaca-se a contagem eletrônica por citometria de fluxo. A contagem microscópica em lâminas é o método de referência para a determinação da CCS em leite cru sendo clássico o método descrito por Prescott & Breed (1910). Objetivou-se avaliar a contagem diferencial de células no leite de vacas com mastite subclínica, por microscopia óptica, em lâminas coradas pela técnica de May Grunwald-Giemsa e Gram. Em ambas as colorações as células apresentaram variações morfológicas. Contudo, o percentual de células não identificáveis não ultrapassou 10% reforçando a aplicabilidade da contagem diferencial de células, como utilizado em leucócitos em esfregaços hematológicos. Ocorreram pequenas variações nas contagens com as duas colorações. Observou-se o predomínio de neutrófilos (>60%), seguidos de linfócitos (>25%) de forma consistente com caracterização das amostras como procedentes de quartos com mastite subclínica. A coloração de May Grunwald-Giemsa apresentou resultados semelhantes ao Gram. As principais diferenças entre as colorações baseiam-se na amplitude e intensidade de coloração, a qual a coloração de Gram destacou-se. Na coloração de Gram, todo o fundo citológico e outros elementos foram evidenciados. O Gram apresentou como vantagem a visualização de vazios circulares correspondentes à gordura, possibilitando definir sobre a presença dos neutrófilos no leite por um tempo prolongado, e em algumas amostras a identificação das bactérias foi facilmente realizada. Conclui-se pela viabilidade da coloração de Gram como alternativa, e ainda mais se utilizada como coloração complementar, o que aumentaria a representatividade das contagens e a possibilidade de observações de outros elementos na amostra.

PALAVRAS-CHAVE. Coloração, citologia, leite, células somáticas.

INTRODUÇÃO

A mastite, inflamação da glândula mamária, é a infecção mais frequente dos animais destinados à produção de leite e a que mais onera a pecuária leiteira. Os impactos econômicos são decorrentes da queda na produção leiteira, perda na qualidade do leite, maior custo de produção e descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários (Lopes et al. 2012).

A contagem de células somáticas (CCS) é um método convencional e amplamente utilizado para o monitoramento da qualidade do leite e saúde da glândula, sendo valiosa para auxiliar os produtores de leite na avaliação dos índices de mastite subclínica em seus rebanhos e para estimativas das perdas econômicas decorrentes (Coldebella et al. 2003, Santos & Fonseca 2007, Lopes et al. 2011). E ainda, é observado um efeito específico dos patógenos na variação da CCS (Souza et al. 2009, Mello et al. 2012).

As células somáticas do leite são leucócitos e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna do teto e são eliminadas no leite durante o curso normal da lactação (Galiero & Morena 2000). Os leucócitos são constituídos por vários tipos de células. Os encontrados no leite da glândula mamária sadia são (aproximadamente): macrófagos (60%), neutrófilos (15%) e linfócitos (25%), e na ocorrência de mastite 90% a 95% do total de células presentes são polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) (Pillai et al. 2001, Sladek et al. 2006, Piepers et al. 2009, Koess & Hamann 2008, Baumert et al. 2009), que migram via circulação sanguínea para a glândula mamária com a função de combater agentes agressores (Blowey & Edmondson 2010, Dong et al. 2012). Apesar de serem essenciais como primeira linha de defesa celular contra os patógenos da mastite (Piepers et al. 2009), os polimorfonucleares (PMN) apresentam grande potencial de destruição do tecido glandular, seja pela secreção de mediadores inflamatórios ou pelo extravasamento citoplasmático decorrente da necrose.

A celularidade do leite é influenciada por fatores como número de lactações, condições climáticas, raça e idade do animal, época do ano, manejo e nutrição, mas a infecção da glândula mamária é o principal fator que leva ao aumento e alteração da celularidade do leite (Pyörälä 2003, Della Libera et al. 2011).

Vários testes podem ser usados para a determinação da contagem diferencial de células no leite. A contagem microscópica é pouco utilizada, pois demanda muito tempo e apresenta baixa reprodutibilidade, devido à subjetividade (Koess & Hamman 2008). Pela praticidade e precisão da técnica destaca-se a contagem eletrônica por citometria de fluxo (Rivas et al. 2001, Dosogne et al. 2003, Koess & Hamman 2008, Piepers et al. 2009, Mira et al. 2013).

Tecnicamente a microscopia direta envolve a contagem total de células e a identificação morfo-

lógica destas, estabelecendo uma distribuição que pode demonstrar a resposta orgânica através do infiltrado leucocitário no leite. Para realização da contagem microscópica direta há possibilidade da utilização de diversos protocolos. A contagem microscópica em lâminas é referência para a determinação da CCS em leite cru sendo clássico o método descrito por Prescott & Breed (1910). Na coloração são empregados corantes padronizados já testados (Rosenfeld 1947, Santos & Vilela 1983, Morgante et al. 1996, Benites et al. 2001). Recentemente, os melhores resultados em diferentes amostras de leite bovino foram obtidos com a coloração de May Grünwald-Giemsa (Viana et al. 2010).

Objetivou-se avaliar a contagem diferencial de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica, por microscopia óptica, em lâminas coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa e pela coloração de Gram.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os quatro quartos mamários de seis vacas pluríparas, mestiças (holandês x zebu), do setor de Bovinocultura de Leite da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, mantidas em regime de pastejo, recebendo concentrado comercial, além de mistura mineral completa e água sem restrição. Avaliações clínicas e hematológicas foram realizadas previamente sendo utilizadas apenas vacas que, além de boa condição física (escore de condição corporal 3,0 ou 3,5) e parâmetros hematológicos normais apresentavam infecção intramamária subclínica identificada pelo California Mastitis Test (CMT) realizado no início da ordenha (Schalm & Noorlander 1957), após higiene da pele do teto e óstio com algodão embebido em álcool 70%.

Após o CMT, de cada quarto mamário foram colhidas amostras de leite. Alíquotas de 40 mL foram transferidas para frascos específicos, contendo o conservante bronopol e recipientes esterilizados isentos de conservante. Amostras contendo bronopol foram homogeneizadas por inversão, mantidas sob-refrigeração e encaminhadas por Sedex, em no máximo 48 horas, para CCS (células/mL), na Clínica do Leite (ESALQ-USP) por método de referência (Brasil 2011).

Das alíquotas sem conservantes foram preparadas lâminas conforme técnica descrita por Pilla et al. (2012), modificada. Uma alíquota de 2,0 mL de leite foi diluída com 5,0 mL de PBS contendo 0,5% de EDTA (PBS-EDTA) e centrifugada a 125 g por 15 minutos em tubos cônicos estéreis. A camada de gordura e o sobrenadante foram desprezados, 10 µL do botão de células do fundo do tubo foi ressuspensionado em 2,0 mL de PBS-EDTA, e posteriormente por meio de pipeta Pasteur distribuído homogeneamente na superfície de lâminas perfazendo uma área de 1 cm². As lâminas foram feitas em duplicata, secas ao ar e coradas com May-Grünwald Giemsa e pelo Gram.

Em cada lâmina foram contadas 100 células, observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) baseando-se na contagem por representação percentual dos diferentes tipos celulares tal como na leucometria global do hemograma, tendo-se apenas adaptado a área de contagem ao tipo de esfregaço, no caso, em movimento de "borda grega" ou alternados do extremo de uma margem a outra da área de 1mm² do esfregaço. Estas células foram diferenciadas e discriminadas em linfócitos, macrófagos e neutrófilos.

A identificação das células foi realizada baseando-se nas similaridades morfológicas entre da microscopia de leucócitos em esfregaços hematológicos (Coles 1987). Simultaneamente a esta contagem de leucócitos, foi registrado o percentual de células não identificáveis, considerando que a presença de células não identificáveis acima de 10% implica em erro significativo e recontagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as dificuldades inerentes ao tipo de amostra (lacteal), uma vez que se trata de identificar células de um infiltrado leucocitário, estas fora do seu meio natural (sangue), e que, estão sujeitas a processos degenerativos como cariorexis e cariólise, apresentaram-se com diversos padrões morfológicos e níveis de reconhecimento variados. Contudo, o percentual de células não identificáveis não ultrapassou 10% nas contagens, reforçando a aplicabilidade da contagem diferencial de células, como utilizado em leucócitos em esfregaços hematológicos.

Ocorreram pequenas variações nas contagens das amostras com as duas colorações, não só por eventuais dificuldades de identificação celular, mas também pela distribuição não uniforme das células nas lâminas, o que foi minimizado por repetições da contagem e identificação de no mínimo de 100 células na amostra.

As médias e o desvio padrão das contagens de células nas colorações de Gram e May-Grünwald Giemsa (Tabela 1) deixam claro que ambas as colorações são viáveis para a identificação e a contagem diferencial das células em esfregaços de leite.

Observou-se a predominância de neutrófilos (>60%), seguidos de linfócitos (>25%), em proporções que diferem daquelas relacionadas para o leite de glândulas mamárias sadias (Sladek & Rysanek 2010, Schwartz et al. 2011) em que predominam macrófagos (60%) e linfócitos (25%) e de mamas com mastite clínica em que os neutrófilos são as células predominantes (Morin 2009) e os PMN chegam a 90% do total de células (Sladek et al. 2005). Sarikaya et al. (2006) constataram que a população celular varia de acordo com a contagem total de células somáticas, evidenciando que a contagem de neutrófilos aumenta enquanto a de linfócitos decai

Tabela 1. Médias em porcentagem das contagens de células nas colorações de Gram e May-Grünwald Giemsa.

Tipos celulares	May-Grünwald Giemsa	Coloração de Gram	Valor de p
Neutrófilos	62,4 ± 18,5	61,9 ± 19,6	0,8123
Monócitos	12 ± 8,3	11,8 ± 9,4	0,9447
Linfócitos	25,6 ± 16,2	25,8 ± 14,5	0,7394
Não Identificadas	1,6 ± 1,6	1,4 ± 1,5	0,621
Outras*	0,2	0	

*Eosinófilos e células epiteliais (1 célula).

com a elevação da CCS. Também, Mira et al. (2013) observaram alterações na celularidade do leite, principalmente por elevação de neutrófilos em relação ao aumento do total de células somáticas. A porcentagem de neutrófilos observada por Mira et al. (2013) em amostras de leite com CCS menor que 200 mil células/mL ($45,34 \pm 27,10$ células) foi menor que a observada no presente estudo.

As contagens celulares com concentração predominante de neutrófilos confirmam a presença de infecção subclínica, visto que o aumento da CCS no leite durante o processo infeccioso da mama ocorre principalmente devido ao influxo de neutrófilos para a glândula mamária (Pyörölä 2003, Morin 2009, Della Libera et al. 2011).

A coloração de May Grünwald-Giemsa apresentou resultados semelhantes ao Gram quanto à diferenciação morfológica e contagem celular, divergindo dos resultados obtidos por Viana et al. (2010) em que a coloração com Broadhurst-Paley, hematoxilina-eosina e corante Panótico®, devido às diversas etapas de lavagem e fixação resultaram em contagens extremamente inferiores, além de apresentarem alterações morfológicas exacerbadas de células quando comparados à coloração de May Grünwald-Giemsa.

As principais diferenças entre o uso alternativo da coloração de Gram e May-Grünwald Giemsa baseiam-se principalmente na amplitude e intensidade de coloração, a qual a coloração de Gram destacou-se. Enquanto na coloração hematológica os elementos corados dos esfregaços restringiram-se às células leucocitárias com um fundo citológico praticamente não corado, na coloração de Gram, todo o fundo citológico e outros elementos foram evidenciados.

O fundo citológico na coloração de Gram apresentou material amorfo rosa entremeado por vazios circulares de diferentes diâmetros, estes correspondentes a imagens negativas de gordura, esta característica embora visualmente saturada, aumentou a possibilidade de discriminar células nucleadas, no caso os diferentes tipos leucocitários.

Neutrófilos são as primeiras células recrutadas durante a infecção mamária (Paape et al. 2003) e predominam no início da inflamação (Sordillo et al. 1997). No leite tendem a ser menos funcionais que os presentes na corrente sanguínea sendo a ingestão de caseína e gordura relacionada com a perda dos pseudópodes, diminuindo drasticamente sua atividade fagocítica e bactericida (Rainard & Riollet 2006). Assim, as células que já estavam presentes no leite são menos efetivas na resposta imunológica do que as células recrutadas e que migram do sangue para o leite (Baumert et al. 2009). A coloração de Gram apresentou como vantagem a visualização de vazios circulares correspondentes à gordura, possibilitando definir sobre a presença dos neutrófilos no leite por tempo prolongado.

Em algumas amostras a identificação das bactérias foi facilmente realizada. Entretanto, a coloração de Gram torna impossível a identificação de granulócitos eosinófilos, uma vez que a saturação cromática rosa impede a evidência deste leucócito. Por outro lado um infiltrado com este tipo celular é raro, só sendo observada uma célula em um dos 24 esfregaços de leite corado com o May-Grünwald Giemsa. Pequeno número de eosinófilos (0,7%) foi também observado por Della Libera et al. (2004) na citologia de lâmina de citocentrifugação de leite de búfalas híidas.

CONCLUSÕES

Ficou clara a viabilidade da técnica da coloração de Gram, como alternativa, e ainda mais se utilizada como uma coloração complementar, o que aumentaria a representatividade das contagens e a possibilidade de observações de outros elementos diagnosticados na amostra de leite a analisar. A identificação morfológica é um aspecto subjetivo e, portanto pode apresentar questões de afinidades pessoais, o que pode ser minimizado pelo exercício prático do emprego da proposta de coloração alternativa.

Comitê de ética. Este trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UFRJ, sob o número 085/2012. (Reunião ordinária 05 de novembro de 2012).

REFERÊNCIAS

- Baumert A., Bruckmaier R.M. & Wellnitz O. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. *Journal Dairy Research*, 76:356-364, 2009.
- Benites N.R., Melville P.A. & Costa E.O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. *Review Napgama*, 3:6-9. 2001.

- Blowey R.W. & Edmondson P. *Mastitis Control in Dairy Herds*. 2nd ed., British Library, London, 2010. 272p.
- Brasil. *Instrução Normativa nº 62 de 30 de dezembro de 2011*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, 2011.
- Coldebella A., Machado P.F., Demétrio C.G.B., Ribeiro Júnior P.J., Corassin C.H., Meyer P.M. & Cassoli L.G. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:1451-1457, 2003.
- Coles E.H. *Veterinary Clinical Pathology*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1987. 421p.
- Della Libera A.M.M.P., Souza F.N., Blagitz M.G. & Batista C.F. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 78:297-300, 2011.
- Dong F., Hennessy D.A. & Jensen H.H. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. *Journal of Dairy Science*, 95:6421-6435, 2012.
- Dosogne H., Vangroenweghe F., Mehrzad J., Massart-Leën A.M. & Burvenich C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *Journal of Dairy Science*, 86:828-834, 2003.
- Galiero G. & Morena C. 2000. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. *Bubalus bubalis* 4:26-27.
- Koess C. & Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*, 75:225-232, 2008.
- Lopes M.A., Demeu F.A., Costa G.M., Rocha C.M.B.M., Abreu L.R., Santos G. & Franco Neto A. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 78(4):493-499, 2011.
- Lopes M.A., Demeu F.A., Rocha C.M.B.M., Costa G.M., Franco Neto A. & Santos G. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 79:477-483. 2012.
- Mello P.L., Agostinis R.O., Barzon E.M., Colombo R.B., Silva A.V. & Martin L.A. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. *Veterinária e Zootecnia*, 19:513-521, 2012.
- Mira C.S., Della Libera A.M.M.P., Souza F.N. & Blagitz M.G. Correlação entre a contagem automática de células somáticas e a porcentagem de neutrófilos pela citometria de fluxo e pela técnica de citocentrifugação. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65:1403-1408, 2013.
- Morgante M., Ranucci S., Pauselli M., Beghelli D. & Mencaroni G. Total and differential cell count by direct microscopic method on ewe milk. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43:451-458, 1996.
- Morin D.E. Mammary gland health and disorders, p.1112-1143. In: Smith B.P. (Ed.), *Large animal internal medicine*. 4th ed. Elsevier, 2009.
- Paape M.J., Bannerman D.D., Zhao X. & Lee J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, 34:597-627, 2003.
- Piepers S., Opsomer G., Meyer E., Demeyere K., Barkema H.W., Kruijff A. & Vlieghe S. Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92:4330-4339, 2009.
- Pilla R., Schwarz D., König S. & Piccinini R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, 95:4410-4420, 2012.
- Pillai S.R., Kunze E., Sordillo L.M. & Jayarao B.M. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *Journal of Dairy Science*, 84:6:1413-1420, 2001.
- Prescott S.C. & Breed R.S. 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *Journal Infectious Diseases*, 7:632-640.
- Pyöralä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.*, 34:565-578, 2003.
- Rainard P. & Rioulet C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development*, 43(5):439-457, 2006.
- Rivas A.L., Quimby F.W., Blue J. & Coksaygan O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:399-407, 2001.
- Rosenfeld G. 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia. Nova combinação dos componentes de May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, 20:329-335.
- Santos E.C. & Vilela M.A.P. 1983. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério da avaliação de qualidade. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 35:907-919.
- Santos M.V. & Fonseca L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Manole, Paulo, 2007. 314 p.
- Sarikaya H., Schlamberger G., Meyer H.H.D. & Bruckmaier R.M. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89:2479-2486, 2006.
- Schalm O.W. & Norlander D.O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. *American Veterinary Medical Association*, 139:199-206, 1957.
- Schwartz D., Diesterbeck U.S. & König S. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 78:448-455, 2011.
- Sladek Z. & Rysanek D. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:12-15, 2010.
- Sladek Z., Rysanek C., Ryznarnova H. & Faldyna M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Research*, 36:629-643, 2005.
- Sladek Z., Rysanek C., Ryznarnova H. & Faldyna M. The role of neutrophil apoptosis during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Medicine*, 51:437-447, 2006.
- Sordillo L.M. Shafer-Weaver K.M. & DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8):1851-1865, 1997.
- Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61:1015-1020, 2009.
- Viana K.F., Setubal B.F., Mendes V.A., Pietralonga P.A.G. & Zanini M.S. Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. *Acta Veterinária Brasileira*, 4:59-63, 2010.