

## Determinação de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês, zinco e contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica

## Determinação de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês, zinco e contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica

Paulo Francisco Domingues<sup>1</sup>; Helio Langoni<sup>1</sup>; Carlos Roberto Padovani<sup>2</sup>; Jorge A. H. Gonzales<sup>3</sup>; Otavio B. Fregonesi<sup>4</sup>

**Resumo:** A proposta do presente trabalho foi pesquisar a relação da mastite bovina com os níveis de nutrientes presentes no leite. Foram utilizadas 72 vacas da raça Holandesa, distribuídas em dois grupos: G1=36 vacas clinicamente sadias e G2=36 vacas com mastite subclínica, diagnosticadas pelo California Mastitis Test – CMT, pela contagem de células somáticas e pelo exame microbiológico. No leite, foram determinados os níveis de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês e zinco. Os dados obtidos foram submetidos a procedimentos estatísticos, e os parâmetros do leite apresentaram as seguintes médias e desvios-padrões, respectivamente: gordura (%)  $1,251 \pm 0,676$  e  $1,662 \pm 1,166$  ( $p > 0,05$ ); proteína (%)  $3,373 \pm 0,428$  e  $3,411 \pm 0,348$  ( $p > 0,05$ ); contagem de células somáticas (após formação logarítmica)  $1,694 \pm 0,632$  e  $2,909 \pm 0,424$  ( $p < 0,0001$ ); Cobre (ppm)  $0,043 \pm 0,015$  e  $0,047 \pm 0,019$  ( $p > 0,05$ ); ferro (ppm)  $0,159 \pm 0,047$  e  $0,191 \pm 0,063$  ( $p < 0,05$ ); manganês (ppm)  $0,040 \pm 0,010$  e  $0,036 \pm 0,010$  ( $p > 0,05$ ) e zinco (ppm)  $3,938 \pm 1,221$  e  $3,658 \pm 1,212$  ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que houve diferença significativa apenas nos níveis de CCS e ferro entre os dois grupos de animais estudados.

**Palavras-chave:** mastite bovina, contagem de células somáticas, microelementos, leite.

**Abstract:** The purpose of this paper was to investigate the relationship between of bovine mastitis and the nutrients concentration in milk. Seventy-two Holstein cows were divided into 2 groups: G1 - clinically healthy cows ( $n = 36$ ) and G2 - subclinical mastitis cows ( $n = 36$ ). Both groups of animals were subjected to the California Mastitis Test – CMT, the somatic cell counting, and the microbiological examination. The concentrations of fat, matter protein, copper, iron, manganese and zinc in the milk sample were determined. The recorded data were statistically analyzed and presented the following means and standard-deviations, according to groups 1 and 2: fat (%)  $1.251 \pm 0.676$  and  $1.662 \pm 1.166$  ( $p > 0.05$ ); protein (%)  $3.373 \pm 0.428$  and  $3.411 \pm 0.348$  ( $p > 0.05$ ); somatic cell counting (after logarithmic basis)  $1.694 \pm 0.632$  and  $2.909 \pm 0.424$  ( $p < 0.0001$ ); copper (ppm)  $0.043 \pm 0.015$  and  $0.047 \pm 0.019$  ( $p > 0.05$ ); iron (ppm)  $0.159 \pm 0.047$  and  $0.191 \pm 0.063$  ( $p < 0.05$ ); manganese (ppm)  $0.040 \pm 0.010$  and  $0.036 \pm 0.010$  ( $p > 0.05$ ) and zinc (ppm)  $3.938 \pm 1.221$  and  $3.658 \pm 1.212$  ( $p > 0.05$ ). It was concluded that there were significant differences in the levels of SCC and iron between the two groups of animals.

**Key words:** bovine mastitis, somatic cell count, microelements, milk.

### 1 Introdução

A mastite se caracteriza por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, e por alterações patológicas do tecido glandular.

Essa afecção constitui um dos maiores entraves à exploração leiteira, tanto pelas perdas econômicas provocadas pela redução da produção, como também devido a alterações dos principais componentes do leite e à diminuição da vida produtiva dos animais, em decorrência do comprometimento dos quartos mamários afetados. Além disso, a mastite pode representar um risco potencial a saúde do consumidor por veiculação de microrganismos causadores de zoonoses.

As perdas econômicas associadas à mastite não estão limitadas apenas à propriedade leiteira. Os prejuízos também se estendem às indústrias de laticínios, uma vez que a infecção provoca alterações na composição do leite, comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

No estágio atual de conhecimento, parece prático e razoável definir mastite como uma enfermidade caracterizada pela ocorrência de um aumento significativo do conteúdo de leucócitos no leite das glândulas mamárias acometidas (BLOOD; RADOSTITS, 1991). Devido ao grande número de casos subclínicos, o diagnóstico da mastite depende de testes indiretos os quais, por sua vez, se baseiam no conteúdo de leucócitos presentes no leite.

<sup>1</sup> Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Núcleo de Pesquisa em Mastites – NUPEMAS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Botucatu-SP, CEP 18618-000. Fone: (14) 6802-6270 e-mail: <domingues@fmvz.unesp.br>

<sup>2</sup> Depto. de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

<sup>3</sup> Médico Veterinário Autônomo.

<sup>4</sup> Acadêmico do Grupo Especial de Treinamento – PET-Veterinária, FMVZ-Botucatu.

Apoio financeiro: Fundação para o Desenvolvimento do Estado de São Paulo - FAPESP

As células somáticas do leite são primariamente leucócitos do sangue, as quais incluem macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Para vacas, a nível de glândula mamária, a contagem de células somáticas (CCS) considerada normal, nos quartos sem infecção, está geralmente abaixo de 200.000 células/mL, mas pode ser inferior a 100.000 células/mL em animais de primeira lactação (HARMON, 1998).

A CCS é importante no monitoramento do *status* inflamatório das glândulas mamárias, seja de um quarto, de uma vaca (amostra composta) ou de um rebanho. Esta inflamação normalmente é o resultado de uma infecção microbiana. As células somáticas têm duas principais funções no úbere: combater os microrganismos e auxiliar na reparação dos tecidos que secretam leite, danificados pela infecção e resultante inflamação (PHILPOT, 1998).

Atualmente, a contagem de células somáticas é tida como o método clássico para monitorar o estado de saúde da glândula mamária. Estudos anteriores mostraram que, nas mastites agudas em vacas, ocorre mobilização de leucócitos, febre, aumento do cortisol sanguíneo e de proteínas, como o fibrinogênio, o complemento, a hepatoglobulina e a ceruloplasmina, e diminuição do ferro e do zinco no soro (ERSKINE; BARTLETT, 1993).

São escassos os trabalhos mostrando a influência da mastite subclínica sobre os níveis de microelementos presentes no leite. Por este motivo, o objetivo do presente trabalho foi determinar, no leite de vacas portadoras de mastite, os níveis de gordura, proteína, células somáticas, cobre, ferro, manganês e zinco.

## 2 Revisão da Literatura

Os elementos minerais reconhecidos como nutricionalmente essenciais para os ruminantes classificam-se em macroelementos ou elementos maiores e microelementos ou elementos traços, de acordo com a sua maior ou menor necessidade pelo organismo animal (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

Cerca de 4-5% do peso total dos animais são constituídos de minerais. Os demais componentes são água ( $\pm$  57%), proteína (18%), gordura (21%) e carboidratos (< 1%). O carbono, o hidrogênio, o oxigênio e o nitrogênio são macroelementos orgânicos, constituintes dos protídeos, dos glicídeos, dos lipídeos e das vitaminas. Por outro lado, os macroelementos inorgânicos como o cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio e enxofre, com elevados requerimentos, têm funções estruturais no organismo. Os microelementos ferro, zinco, cobre, manganês, iodo, cobalto, molibdênio, selênio e flúor, cujos requerimentos são menores, atuam, principalmente, na síntese dos sistemas enzimáticos e dos hormônios (LLOYD *et al.*, 1982; McDOWELL, 1985; BLOOD; RADOSTITS, 1991; CAVALHEIRO; TRINDADE, 1992).

### 2.1 Cobre

A função biológica do cobre (Cu) é exercida por proteínas que o contém, incluindo a superóxido-dismutase

(SOD) e a ceruloplasmina (PROHASKA; LUKASEWYCZ, 1990).

A maior concentração de cobre no organismo animal se verifica no fígado. Entretanto, sua concentração nos tecidos varia de acordo com a espécie, a idade e o estado nutricional do animal. As variações individuais dentro das espécies são muito grandes.

O cobre também circula no organismo animal combinado a algumas proteínas. Na maioria das espécies, o nível normal de cobre sanguíneo é de 80 a 120 mcg/100 mL. No plasma sanguíneo, 95% do cobre está presente na forma de um complexo cobre-proteína denominado ceruloplasmina, com peso molecular de 150 KD, contendo 8 átomos de cobre por molécula. É também um constituinte de algumas enzimas existentes no plasma, tais como a citocromo-oxidase, a amino-oxidase, a tirosinase, a catalase e a ácido-ascórbico-oxidase, e participa em diversas reações de oxidação no organismo (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

Quando o seu nível sérico se encontra inadequado, as funções fisiológicas e metabólicas relacionadas a essas enzimas podem ser prejudicadas e, durante deficiências clínicas, podem aparecer sintomas. Além disso, essa deficiência pode influenciar a magnitude da lesão que ocorre nos tecidos durante os processos inflamatórios (DAYRELL, 1983).

As enzimas ligadas ao cobre participam de reações que utilizam o oxigênio como substrato, protegendo os tecidos contra a oxidação por radicais livres. Tanto a ceruloplasmina, quanto a superóxido-dismutase estão diminuídas na corrente sanguínea, quando há deficiência de cobre disponível. A falta dessas proteínas diminui a capacidade de reação do organismo contra a destruição dos tecidos por organismos exógenos (MACHADO; HARMON, 1996).

O cobre tem papel importante no mecanismo de defesa da glândula mamária (ERSKINE; BARTLETT, 1993), devido ao aumento da concentração sérica de cobre ligado a proteína, a ceruloplasmina.

A fagocitose e a destruição dos microrganismos são importantes funções imunocelulares dos macrófagos e neutrófilos, o que é importante na proteção da glândula mamária contra infecções por bactérias patogênicas (CONNER *et al.*, 1986).

O teor de cobre no leite é variável, dependendo da espécie animal, do estágio da lactação e do suprimento de cobre na dieta. Em todas as espécies, o colostro é especialmente rico em cobre e o leite da fase inicial da lactação é mais rico que o da fase final, ocorrendo um decréscimo progressivo no teor desse elemento durante o período de lactação (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

### 2.2 Zinco

O zinco (Zn) é requerido para a atividade biológica de mais de 70 enzimas, em diferentes espécies. As enzimas zinco-dependentes participam de uma grande variedade de processos metabólicos incluindo os dos carboidratos, dos lipídeos, das proteínas e a síntese

ou degradação dos ácidos nucléicos. Esse metal está presente em várias desidrogenases, aldolases, peptidases e fosfatases. É essencial para o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação das células (VALLEE; WILLIAMS, 1968; PRASAD, 1984, 1985). É requerido, ainda, para síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) e do ácido ribonucléico (RNA).

Segundo Beisel (1982), a deficiência é fácil e rapidamente produzida, já que não existe órgão específico para estocagem do zinco. Esse autor afirma, ainda, que a deficiência do zinco, está, geralmente, associada com outras deficiências nutricionais.

A concentração de Zn no organismo animal varia de acordo com as espécies consideradas e encontra-se localizada, principalmente, no núcleo celular. Comparativamente aos outros oligoelementos minerais, ele é encontrado em taxas relativamente altas no leite de vaca (3,0 a 5,0 mg/mL). A sua concentração no sangue de bovinos adultos é de 0,25 a 0,35 mg/100 mL, encontrando-se 75,0% nas hemácias, 22,0% no plasma e 3,0% nos leucócitos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

O zinco desempenha um importante papel no funcionamento normal do organismo, pois está envolvido com a síntese protéica e com o metabolismo dos glicídeos. Está também envolvido com o metabolismo da vitamina A, mantendo as concentrações normais dessa vitamina no sangue, mobilizando-a do fígado (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

Níveis deficientes de zinco afetam marcadamente a morfologia das células envolvidas na resposta imune, a contagem de polimorfonucleares e monócitos, a produção blástica celular, e a resposta geral do sistema imune (SHEFFY; WILLIAMS, 1982). Pesquisas relacionando o Zn com a resistência à mastite são limitadas.

Verheijden *et al.* (1983) observaram, em vacas portadoras de mastite espontânea ou induzida, um declínio nas concentrações de zinco plasmático e no leite dos quartos afetados. Os autores afirmam que as alterações no metabolismo do zinco, nos quartos com afecção deve ter um importante papel no mecanismo de defesa local do úbere.

## 2.3 Ferro

O organismo animal contém cerca de 0,005 a 0,009% de ferro (Fe), sob a forma complexa, das quais, aproximadamente, 57,0% estão presentes na hemoglobina e 7,0% na mioglobina (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

O ferro está presente no corpo dos animais, principalmente sob a forma de complexo, ligado a proteínas como os compostos heme (hemoglobina ou mioglobina), enzimas heme (citocromos mitocondriais e microssômicos, catalase e peroxidase) ou compostos não-heme (transferrina e ferritina). O ferro sanguíneo está contido, principalmente, na hemoglobina eritrocitária e na transferrina plasmática. Enquanto a transferrina-ferrosanguíneo não hemolítico, está ligada à  $\beta$ -globulina. Dois átomos do íon férrico unem-se à proteína plasmática, que serve

como um carreador de ferro no sistema vascular. A concentração normal do ferro plasmático é de 100 a 300  $\mu\text{g/dL}$  (SWENSON, 1984), e no leite de bovinos chega a 100 a 2400  $\mu\text{g/L}$  (ROBINSON, 1990).

Os mecanismos de proteção da glândula mamária podem ser classificados, basicamente, em inatos ou inespecíficos, e adquiridos ou específicos. A imunidade inespecífica é determinada pela proteção inicial proporcionada pelo epitélio do canal do teto, e por uma série de fatores químicos-humorais, tais como a lactoferrina, transferrina, lisozima, lactoperoxidase e proteínas do sistema complemento (SANDHOLM; KORHONEN, 1995).

A lactoferrina é uma glicoproteína com capacidade de ligar íons férricos com íons bicarbonato, restringindo o ferro disponível para as bactérias. O ferro é um dos micronutrientes mais limitantes do crescimento bacteriano, principalmente das espécies de estafilococos e coliformes, que o utilizam em enzimas da cadeia respiratória. No leite, a lactoferrina é produzida pelas células epiteliais e fagocitárias, e sua concentração aumenta, marcadamente, na ocorrência da mastite (OTERO; CRUZ, 1992; ERSKINE; BARTLETT, 1993; SANDHOLM; KORHONEN, 1995).

## 2.4 Manganês

Sabe-se pouco sobre as formas químicas ou combinações do manganês (Mn) no organismo animal. Inúmeros sistemas enzimáticos são ativados *in vitro* por esse elemento. O fato de se concentrar nas mitocôndrias tem corroborado a hipótese de que, *in vivo*, ele está envolvido na regulação parcial da fosforilação oxidativa (SWENSON, 1984).

O manganês está distribuído por todo o corpo, mas sua quantidade total é muito inferior à de outros elementos, correspondendo a cerca de 10% do conteúdo de cobre (SWENSON, 1984). A sua concentração no leite bovino situa-se entre 3 e 370  $\mu\text{g/L}$  (ROBINSON, 1990).

## 3 Material e Métodos

Foram utilizados animais de uma propriedade produtora de leite tipo B, que mantém, em média, 250 animais em lactação, sob regime de *free stall*, com três ordenhas mecânicas diárias, localizada no município de São Pedro, Estado de São Paulo. Foram utilizadas 72 (setenta e duas) vacas da raça Holandesa, primíparas e múltiparas, em diferentes estágios de lactação, divididas em dois grupos:

Grupo 1 (G1): constituído por 36 vacas clinicamente sadias, caracterizado como controle.

Grupo 2 (G2): constituído por 36 vacas portadoras de mastite subclínica, em um ou mais quartos mamários, diagnosticadas pelo teste do California Mastitis Test – CMT<sup>1</sup> (SCHALM; NOORLANDER, 1957), pela contagem eletrônica de células somáticas e pelo exame microbiológico (CARTER; COLE JUNIOR (1990).

As amostras de leite compreenderam os primeiros jatos de leite na primeira ordenha do dia.

Os tetos foram lavados com água e secos com toalha de papel descartável, seguido da antisepsia com álcool 70%, e as amostras, colhidas em frascos de vidro esterilizados, de acordo com o tipo de análise pretendida. Para o exame microbiológico, e para determinação de minerais foram coletados, aproximadamente, 10 mL. Essas amostras foram transportadas para o laboratório, sob refrigeração em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Para a determinação da contagem de células somáticas (CCS), foram colhidas amostras compostas dos quatro quartos mamários em volume aproximado de 50 mL de leite em frascos de plásticos contendo o conservante dicromato de potássio. Após a colheita, as amostras foram homogeneizadas e encaminhadas ao laboratório.

No laboratório, o volume de 10 mL das amostras de leite positivas no CMT, com escores 1+, 2+ e 3+, foram semeadas em placas de Petri contendo meios de ágar-sangue<sup>2</sup> bovino 10% e ágar MacConkey<sup>3</sup>, incubadas a 37°C, e com leituras após 24, 48 e 72 horas, para observação da morfologia das colônias. Foram preparadas lâminas coradas pelo método de Gram, para se verificar a morfologia bacteriana e sua característica tintorial. Após repique para meio de caldo cérebro-coração<sup>4</sup> (BHI), foram realizadas as provas taxonômicas, segundo Carter e Cole Junior (1990).

A contagem de células somáticas<sup>5</sup>, bem como a determinação da porcentagem de gordura<sup>6</sup> e de proteína<sup>6</sup> do leite, foram realizadas em aparelho eletrônico, no Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ, USP, Piracicaba-SP.

A determinação dos minerais foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro de absorção atômica – PerKin - Elmer, mod. 2380), no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, do Departamento de Ciências do Solo da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Campus de Botucatu, SP (BEISEL, 1982).

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo teste multivariado T<sup>2</sup> de Hotelling para comparação dos valores de médias (WICHERN; JOHNSON, 1992). As discussões foram realizadas no nível de 5% de significância.

## 4 Resultados

Dos 72 animais submetidos ao exame clínico e ao CMT, totalizaram-se 288 quartos mamários, dos quais 6 (2,1%) estavam atrofiados. Dos quartos em produção láctea, 82 (28,5%) apresentaram positividade ao teste CMT, sendo 21 (7,3%) amostras 1+, 20 (6,9%) amostras 2+ e 41 (14,3%) amostras 3+ e as 200 (69,4%) restantes, negativas.

Do total de 82 amostras positivas no CMT e submetidas ao exame microbiológico para determinação da

microbiota, 7 (8,5%) mostraram-se negativas. As 75 (91,5%) amostras positivas possibilitaram o isolamento de 88 microrganismos, em cultura pura ou em associação, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Distribuição dos microrganismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 82 amostras de leite de quartos mamários positivos no California Mastitis Test – CMT.

-
---

**Tabela 2** – Distribuição dos microrganismos isolados em associação em 82 amostras de leite, de vacas positivas ao California Mastitis Test – CMT.

-
---

Os parâmetros analisados nas amostras de leite apresentaram as seguintes médias e desvios-padrão, nos grupos G1 e G2 respectivamente. Observou-se diferença estatística significativa na contagem de células somáticas e na concentração de ferro entre os dois grupos, como pode ser apreciado na Tabela 3.

**Tabela 3** – Médias, desvios-padrões e resultados do teste estatístico multivariado dos valores dos constituintes obtidos nas amostras de leite analisadas.

	±	±
í	±	±
	±	±
	±	±
	±	±
	±	±

(\*) Contagem de células somáticas: variável sob a transformação logarítmica.

## 5 Discussão

Do total de 82 amostras positivas no CMT e submetidas ao exame microbiológico para determinação da microbiota, sete (8,5%) mostraram-se negativas. As 75 (91,5%) amostras positivas possibilitaram o isolamento de 88 microrganismos em cultura pura ou em associação (Tabelas 1 e 2). O resultado, quanto ao número de amostras negativas observadas no exame microbiológico, é similar aos resultados obtidos por Langoni (1995) e Costa *et al.* (1986), que encontraram 11,2% e 6,0%, respectivamente.

Quanto aos microrganismos isolados nesse trabalho, observa-se que houve predomínio de *Corynebacterium bovis* (39,8%), *Staphylococcus aureus* (20,5%) e *Staphylococcus epidermidis* (19,3%). Esses dados corroboram com os resultados observados por Langoni *et al.* (1991) sendo diferentes as porcentagens de isolamento das cepas de *S. aureus* (31,56%), *S. epidermidis* (30,18%) e *C. bovis* (5,52%).

Neste trabalho, observou-se que, nas vacas infectadas, a CCS variou entre 120.000 células/mL e 4.259.000 células/mL. O menor valor foi observado em quarto infectado por *Staphylococcus epidermidis* enquanto o maior valor foi associado à presença do *Streptococcus agalactiae*. A maioria das pesquisas indica que uma vaca com uma CCS inferior a 200.000 células/mL provavelmente não está infectada com patógeno importante, enquanto que CCS superiores a 300.000 células/mL são muito sugestivas de infecção (PHILPOT, 1998).

Harmon (1998) explica que a maioria dos estudos indica que o uso exclusivo da CCS, com a finalidade de classificar quartos em infectados ou não infectados, resulta em algum grau de erro devido aos resultados falso-positivos e falso-negativos. Esses erros podem, em parte, ser devido à flutuação normal da CCS observada durante o curso de uma infecção.

O zinco encontra-se localizado principalmente no núcleo celular. Em comparação com os outros oligoelementos minerais, ele é encontrado em taxas relativamente altas no leite de vaca (3,0 a 5,0 mg/mL) segundo Robinson (1990). Assim, nesse estudo, verificou-se que os resultados foram equivalentes ao citado por esse autor, demonstrando que não houve diminuição de zinco nas amostras de leite de quartos mamários infectados.

A maior concentração de ferro observada no grupo de animais com mastite pode ser devido ao aumento da permeabilidade capilar, possibilitando maior afluxo de hemácias, leucócitos, e transferrina do sangue e aumento na concentração de lactoferrina na glândula mamária (OTERO; CRUZ, 1992; ERSKINE; BARTLETT, 1993; SANDHOLM; KORHONEN, 1995). Verificou, entretanto, que os valores de concentração de ferro no leite obtidos nesse estudo apresentam-se dentro da normalidade, conforme Robinson (1990).

Os valores observados quanto aos minerais e proteína, nos dois grupos, estão dentro da faixa de normalidade. No entanto, para a gordura, os níveis encontrados nesse trabalho, estão abaixo dos valores

considerados normais, por volta de 3,5% (ROBINSON, 1990). A porcentagem menor, observada no presente trabalho, deveu-se, provavelmente, ao momento da colheita de leite, que foi no início da ordenha, já que ocorrem alterações do início ao final da ordenha, sendo menor a concentração de gordura no início da mesma (SWENSON, 1984).

## 6 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. Os valores médios das concentrações do ferro e da contagem de células somáticas no leite foram maiores no grupo com mastite subclínica ( $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$ ).

2. Os valores médios dos níveis de gordura, de proteína, do cobre, do manganês e do zinco no leite não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos.

## Referências

- AFONSO, J.A.B.; VIANNI, M.C.E. Variação do teor de cloretos e acidez Dornic no leite de vacas com mastite induzida experimentalmente. *Rev. Univ. Rural*, v.17, p.1-6, 1995.
- ANDRIGUETTO, J. *et al.* *Nutrição animal*. São Paulo: Nobel, 1982. v.1, 395p.
- BEISEL, W.R. Single nutrients and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.35, supl., p.417-68, 1982.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. *Clínica veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263p.
- CARTER, G.R.; COLE JUNIOR, J.R. *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 5. ed. New York: Academic Press, 1990. 620p.
- CONNER, J.G. *et al.* Acute phase response and mastitis in the cow. *Res. Vet. Sci.*, v.41, p.126-8, 1986.
- COSTA, E.O. *et al.* Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol.*, v.17, p.107-12, 1986.
- DAYRELL, M.S. *Suplementação mineral para gado de leite*. EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite-CNPGL, Coronel Pacheco, Circ. Téc., n.18, 1983. 20p.
- ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C. Serum concentrations of copper, iron, and zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.408-13, 1993.
- HARMON, R.J. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p.7.
- LANGONI, H. *Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública*. 1995. 200p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- LANGONI, H. *et al.* Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.43, p.507-15, 1991.
- LLOYD, L.E.; Mc DONALD, B.E.; CRAMPTON, E.W. *Fundamentos de nutriccion*. Zaragoza: Acribia, 1982. 464p.
- MACHADO, P.F.; HARMON, R.J. Nutrição e mastite em bovinos de leite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE BOVINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. 2, 1996, Nova Odessa. *Anais...* Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1996. p.1-9.
- McDOWELL, L.R. *Nutrition of grazing ruminants in warm climates*. Orlando: Academic Press, 1985. 443p.
- OTERO, F.D., CRUZ, J.R.S. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina en las fases de involución y lactación. *Veterinária Méx City*, v.23, p.357-65, 1992.
- PHILPOT, W.N. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p.28.
- PROHASKA, J.R.; LUKASEWYCZ, O.A. Effects of copper deficiency on the immune system. In: BENDICH, A.; PHILLIPS, M.; TENDERDY, R.P. Antioxidant nutrients and immune functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.262, p.123-43, 1990.
- ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology: The microbiology of milk*. 2 ed. v.1. London: Elsevier Applied Science, 1990. 301p.
- SANDHOLM, M.; KORHONEN, H. Antibacterial defence mechanisms of the udder. In: SANDHOLM, M. *et al.* *The bovine udder and mastitis*. Helsinki: Gummerus Kirjapaino Oy, 1995. p.37-48
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *JAVMA*, v. 130, p.199-204, 1957.
- SHEFFY, B.E.; WILLIAMS, A.J. Nutrition and the immune response. *JAVMA*, v.180, p.1073-6, 1982.
- SWENSON, M.J. *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 799p.
- VERHEIJDEN, J.H.M. *et al.* Pathophysiological aspects of *E. coli* mastitis in ruminants. *Vet. Res. Commun.*, v.7, p.229-36, 1983.
- WICHERN, D.W.; JOHNSON, R.A. *Applied multivariate statistical analysis*. 3.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 642p.