

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação de método alternativo para análise de leite e sangue no diagnóstico de mastite bovina – *Point-of-care* sem reagentes

Alexandra Isabela Conceição Costa

MI 2024



Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto**

Alexandra Isabela Conceição Costa

Avaliação de método alternativo para análise de leite e sangue no diagnóstico de mastite bovina – Point-of-care sem reagentes

Patologia e Clínica Laboratorial

Orientador(s): Prof. Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Coorientador(es): Prof. Doutor Rui Costa Martins

Prof. Doutora Teresa Raquel Guerra Barroso

Prof. Doutor Luís André de Oliveira Pinho

Porto, 2024

RESUMO

A mastite é das principais patologias que afetam os bovinos leiteiros, caracterizada por uma inflamação do tecido mamário. Esta condição resulta em perdas económicas significativas para a indústria leiteira global, devido aos custos com prevenção, tratamento, redução da produção de leite, abate de animais e descarte de leite contaminado. A incidência de mastite aumenta quando os mecanismos de defesa da glândula mamária estão comprometidos, sendo influenciada por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais que enfraquecem a imunidade do gado.

Nos últimos anos, o setor pecuário tem enfrentado desafios crescentes, com um foco maior na qualidade em detrimento da quantidade. As exigências dos consumidores em relação à segurança alimentar, bem-estar animal, sustentabilidade ambiental e qualidade dos produtos têm tido um impacto cada vez mais relevante.

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é amplamente utilizada como indicador de saúde do úbere e, cada vez mais, como medida indireta da qualidade do leite. A análise hematológica, em particular a contagem de glóbulos brancos (WBCs), tem mostrado uma correlação positiva com a CCS, podendo contribuir para o diagnóstico de mastite subclínica.

Este estudo teve como objetivo avaliar uma nova tecnologia de Point-of-Care sem reagentes (POC), correlacionando os resultados da CCS no leite com os dados hematológicos, e comparando-os com medições convencionais. O “MyVet”, demonstrou ser capaz de alcançar resultados consistentes em todos os parâmetros avaliados. Isso sugere que a ferramenta pode ser uma adição valiosa à prática veterinária. No entanto, embora os resultados obtidos até o momento sejam promissores, estudos futuros são essenciais para explorar todo o potencial dessa tecnologia POC.

Palavras-chave: Point-of-Care (POC), Tecnologia Sem Reagentes, Análise de Sangue e Leite, Mastite

CASUÍSTICA E ATIVIDADES REALIZADAS

O presente relatório descreve o estágio em investigação clínica laboratorial, realizado ao longo de aproximadamente seis meses, de março a agosto de 2024, em vacas leiteiras de seis explorações situadas na bacia leiteira entre o Douro e o Minho. Durante este período, o objetivo foi avaliar e validar diversos parâmetros analíticos no leite de vaca e no sangue bovino, como a contagem de células somáticas (CCS), o teor de gordura butírica, as proteínas totais e a ureia e o hemograma.

O MyVet é um novo dispositivo POC (Point of Care) sem reagentes, que utiliza espectrometria inteligente para realizar análises clínicas com uma única gota de sangue ou leite. O objetivo foi explorar os dados obtidos por este sistema POC, de forma a auxiliar o Médico Veterinário na prevenção, gestão e monitorização da mastite clínica e subclínica, utilizando uma ferramenta diagnóstica no campo e em tempo real, destacando a sua portabilidade, facilidade de utilização e ausência de reagentes.

Tabela 1 - Casuística do Estágio

Programa de estágio						
	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
Pesquisa bibliográfica	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Colheita de amostras de leite e recolha dados espectrais de leite	✓	✓	✓		✓	
Colheita de sangue e recolha de dados espectrais do sangue			✓	✓	✓	
Análise de hemogramas pelo método de referência			✓	✓	✓	
Estabelecer relação entre a informação espectral obtida com resultados obtidos por métodos de referência					✓	✓

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela constante presença e apoio incondicional, por estarem sempre ao meu lado quando mais preciso.

Ao Arménio, que não me permitiu desistir deste sonho, e aos meus amigos Susana, Mena, Pedro e Katherine, pela paciência e apoio, especialmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de trabalho, por todo o suporte que me ofereceram ao longo destes seis anos, e pelas inúmeras vezes em que trocaram horários comigo para que eu pudesse concluir esta longa jornada.

Às minhas companheiras de estudo, Ana, Cláudia, Rita e Martas, pelas incontáveis horas de estudo, desempenhando um papel crucial e tornando este percurso muito mais descontraído e gratificante.

A todo o corpo docente do MIMV, pela confiança depositada em mim.

À Dra. Adelaide da Segalab, pela ajuda e disponibilidade.

Um agradecimento especial à Professora Andreia, pela ajuda e apoio.

Ao meu orientador e coorientadores, pela disponibilidade e compreensão contínuas ao longo deste estágio.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Suscetibilidade à mastite	2
1.1.1.	Defesas anatómicas.....	3
1.1.2.	Defesas celulares.....	3
1.1.3.	Defesas Solúveis	5
1.2.	Indústria leiteira.....	6
1.2.1.	Tecnologia	7
1.3.	Contagem de células somáticas.....	9
1.3.1.	Nível de infecção da glândula mamária	10
1.3.2.	Fase da lactação	10
1.3.3.	Idade/Raça	10
1.3.4.	Paridade/Temporada/Stress	10
1.3.5.	Variação diária.....	11
1.3.6.	Fatores genéticos	11
1.3.7.	Processos de amostragem	11
1.4.	Hemograma	12
1.5.	Marcadores Indicativos de Mastite	13
2.	ESPECTROSCOPIA	16
2.1.	Espectroscopia UV-Visível.....	16
2.2.	Espectroscopia infravermelho	17
2.3.	Recolha de espectros em amostras	17
2.4.	Tecnologia POC “MyVet”	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Caraterização da Amostra.....	22
3.2.	Implementação do método analítico.....	22
3.3.	Quantificação Espectral	24
3.4.	Validação.....	25
4.	RESULTADOS.....	25
4.1.	Espectroscopia do Leite/ FC Fossomatic™, NIR DS 2500®	25
4.2.	Espectroscopia do sangue/ ADVIA® 2120.....	28
4.3.	Relação entre parâmetros do leite e o hemograma	31
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	33
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática mostrando glândula mamária saudável e com mastite	12
Figura 2 - Mapa da Bacia Leiteira Entre Douro e Minho	21
Figura 3 - Colheita e processamento de amostras de sangue e leite	23
Figura 4 - Espectro representativo de um conjunto de amostras de leite	25
Figura 5 - Correlação entre a quantificação espectral (eixo y) de teor butírico (TB) e métodos convencionais (eixo x)	26
Figura 6 - Correlação entre a quantificação espectral de teor Proteico (TP) e métodos convencionais	26
Figura 7 - Correlação entre a quantificação espectral da contagem de células somáticas (CCS) e métodos convencionais	27
Figura 8 - Correlação entre a quantificação espectral de ureia e métodos convencionais	27
Figura 9 - Espectro representativo de um conjunto de amostras de sangue	28
Figura 10 - Correlação entre a quantificação espectral de hemoglobina (Hgb) e métodos convencionais	29
Figura 11 - Correlação entre a quantificação espectral de eritrócitos (RBC) e métodos convencionais	29
Figura 12 - Correlação entre a quantificação espectral de hematócrito (HTC) e métodos convencionais	30
Figura 13 - Correlação entre a quantificação espectral de Leucócitos (WBC) e métodos convencionais	30
Figura 14 - Correlação entre a quantificação espectral das plaquetas (PLT) e métodos convencionais	31
Figura 15 – Análise vetorial do PCA das componentes principal 1 (33.38%) e a componente principal 2 (17.55%) e PCA da componente principal 2 (17.55%) e componente principal 3 (12.29%)	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Casuística do Estágio.....	ii
Tabela 2: Imunoglobulinas nas secreções lácteas dos bovinos.....	5
Tabela 3: Critérios de qualidade aplicáveis ao leite cru de vaca. Regulamento (CE) nº 853/2004	9
Tabela 4: Resumo dos métodos diagnósticos para marcadores de mastite	14
Tabela 5: Resumo comparativo de estudos representativos da capacidade de previsão da espectroscopia NIR nos parâmetros da qualida-de do leite.....	18
Tabela 6:: Resultados da correlação de Person e Mape, obtidos por PCA, entre os parâmetros do hemograma e do leite	32

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Absorbância

BIL – Bilirrubina

BLL – Lei de Lambert-Beer

CCS – Contagem de Células Somáticas

CE – Comunidade Europeia

COVM – Modos de Covariância

DGAV – Direção Geral da Alimentação e Veterinária

FIR – Infravermelho Distante

FTIR – Fourier Transformed Infrared Spectroscopy

HCT – Hematócrito

Hgb – Hemoglobina

IFN – Interferon

Igs – Imunoglobulinas

IL – Interleucina

INESC TEC – Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, Tecnologia e Ciência

IR – Infravermelho

LRL – Locais de recolha de Leite

MAPE – Erro Percentual Médio Absoluto

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIR – Infravermelho Médio

MVDA – Análise Multivariada

NIR – Infravermelho Próximo

NK – Natural Killer

PCA – Análise de Componentes Principais

PCOL – Plano de Controlo Oficial do Leite

PLF – Agricultura de precisão para Pecuária

PLT – Plaquetas

PMN – Polimorfonucleares

R – Correlação de Person

RAM – Resistência aos Antimicrobianos

RBC – Contagem Glóbulos Vermelhos

SLAI – Self Learning Artificial Intelligence

T – Transmitância

TP – Teor Butiroso

TGT – Teor de Germes Totais

TP – Teor Proteico

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

WBC – Contagem de Glóbulos Brancos

1. INTRODUÇÃO

Existem 20 milhões de bovinos de leite na Europa, num total de mais de 500.000 explorações (Eurostat, 2024). Em Portugal estão contabilizados cerca de 250.000 bovinos de leite e cerca de 3800 explorações leiteiras, muitas com mais de 100 vacas e elevados níveis de automatização (IFAP, 2024). A principal patologia que afeta este efetivo é a mastite, que é uma resposta inflamatória do tecido do úbere da glândula mamária, podendo ter etiologia infecciosa ou não infecciosa, não obstante a maioria das inflamações são provocadas por microrganismos. A mastite impõe perdas económicas consideráveis à indústria leiteira de todo o mundo. Estas perdas económicas devem-se às despesas adicionais na prevenção e tratamento da mastite e às perdas devidas a outros fatores, incluindo a redução da produção de leite, abate e leite descartado (Aghamohammadi et al., 2018). Os únicos dados existentes para o nosso país, estimam que as perdas devidas às mastites correspondem a um prejuízo de 249€/vaca/ano (Aires, 2010) valores um pouco mais elevados do que os reportados para os Estados Unidos (185 USD/vaca/ano) (Akers & Nickerson, 2011).

A doença é causada principalmente por infeções bacterianas e é classificada em dois tipos com base na epidemiologia: mastite contagiosa e ambiental. As primeiras são causadas por bactérias contagiosas, incluindo *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp. *Corynebacterium bovis*, e *Streptococcus dysgalactiae* e são transmitidas de vacas infetadas para animais saudáveis. A transmissão ocorre geralmente no momento da ordenha, através das mãos, toalhas e/ou máquina de ordenha, que atuam como reservatórios bacterianos (Sharun et al., 2021). Na maioria das vezes a infeção alastra por contaminação de microrganismos existentes em um ou mais quartos mamários, através do canal do teto (Aghamohammadi et al., 2018). Por outro lado, a mastite ambiental é causada por bactérias que se encontram principalmente fora da sala de ordenha, ou seja, bactérias presentes no meio ambiente, como no material de cama, solo, fezes e água estagnada, e normalmente estão envolvidos os seguintes agentes etiológicos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Streptococcus uberis*, leveduras, algas e fungos (Sharun et al., 2021).

As mastites são também classificadas de acordo com as características clínicas, em mastite clínica e subclínica. As mastites subclínicas caracterizam-se pela inexistência de alterações clínicas relevantes, ainda assim, sendo uma infeção/inflamação da glândula mamária, a produção de leite diminui e a contagem de células somáticas normalmente aumenta. A mastite clínica exhibe alterações clínicas evidentes, caracterizadas essencialmente pela presença de alterações macroscópicas no leite e alterações no teto/glândula mamária como edema, aumento da temperatura local, rubor, aumento da sensibilidade e endurecimento, congestão dos quartos mamários afetados, podendo ainda cursar com sintomatologia sistémica (Abebe et al., 2016). Estas duas formas são completamente diferentes: as formas

subclínicas de mastite são 15 a 40 vezes mais frequentes, são muito mais difíceis de diagnosticar e têm marcadas implicações para a indústria leiteira, não só por poderem evoluir para formas clínicas, mas também por acarretarem acentuados prejuízos económicos (Adkins & Middleton, 2018; Ashraf & Imran, 2018).

1.1. Suscetibilidade à mastite

A incidência de mastite aumenta quando os mecanismos de defesa da glândula mamária estão prejudicados. O gado leiteiro está exposto a numerosos fatores genéticos, fisiológicos e ambientais que podem comprometer a imunidade do hospedeiro e aumentar a incidência de mastite. A ênfase na seleção genética para maximizar a produção de leite aumentou a exaustão metabólica associada à síntese e secreção do leite, existindo uma correlação negativa entre a capacidade de produção de leite e a resistência à mastite (Oltenu & Broom, 2010). Portanto, é provável que a resistência à mastite diminua nas populações de gado leiteiro que estão sob seleção para melhorar a produção de leite. Do ponto de vista ambiental, a remoção do leite pelas máquinas de ordenha pode causar trauma nos tecidos das extremidades dos tetos, o que facilita a colonização por organismos causadores de mastite. Para além disso, o confinamento total, o aumento da densidade de vacas por unidade de área e o uso de materiais de cama que permitem o crescimento bacteriano também podem ter um impacto marcante na suscetibilidade do gado leiteiro à mastite, suprimindo importantes mecanismos de defesa locais. No entanto, são os fatores fisiológicos os mais importantes, uma vez que um dos fatores mais significativos que influenciam as capacidades de defesa da glândula mamária é o estado da lactação (Paibomesai et al., 2018). O gado leiteiro é especialmente suscetível à mastite durante o período periparturiente, devido à diminuição dos mecanismos de defesa da glândula mamária. A glândula mamária é protegida por diversos mecanismos de defesa, que podem ser separados em duas categorias distintas: imunidade inata e imunidade específica. A imunidade inata, também conhecida como resposta inespecífica ou não imune, é a defesa predominante durante os períodos iniciais da infeção. Respostas inespecíficas estão presentes ou são ativadas rapidamente no local da infeção por numerosos estímulos, mas não são aumentadas pela exposição repetida ao mesmo insulto. Se os mecanismos de defesa inespecíficos funcionarem adequadamente, a maioria dos agentes patogénicos são eliminados em pouco tempo e antes que o sistema imunológico específico seja ativado. Muitas vezes, a rápida eliminação de bactérias não resulta em mudanças perceptíveis na qualidade ou produção do leite. As defesas inespecíficas ou inatas da glândula mamária são mediadas pela barreira física da extremidade do teto. Se um agente patogénico conseguir escapar ou não for completamente eliminado pelo sistema de defesa inato, o sistema imunológico específico ou adquirido é acionado. As respostas imunes adquiridas reconhecem determinantes antigénicos específicos de um determinado agente patogénico, ou seja, se um hospedeiro encontrar o mesmo antígeno mais de uma vez, ocorre um estado aumentado de reatividade

imunológica como consequência da memória imunológica. Em comparação com a primeira exposição a um antígeno bacteriano, uma resposta de memória será muito mais rápida, consideravelmente mais forte, mais duradoura e muitas vezes mais eficaz na eliminação do agente em causa (Sordillo, 2018). O sistema imunológico é capaz de distinguir “o próprio” do “não próprio” e reagir seletivamente apenas a antígenos estranhos por meio de proteínas ligadas à membrana, chamadas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Uma resposta imune específica só ocorrerá se os antígenos forem combinados com uma molécula MHC na superfície de certas células, um processo conhecido como apresentação de antígenos. O reconhecimento de fatores de patogenicidade para eliminação é mediado por macrófagos, diversas populações linfoides e imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos. Na glândula mamária, é necessário que tanto a imunidade inata como a adquirida sejam altamente interativas e coordenadas, a fim de proporcionar proteção ideal contra a mastite (Sordillo, 2018).

1.1.1. Defesas anatómicas

A extremidade do teto é considerada a primeira linha de defesa contra a mastite, uma vez que é a via pela qual os agentes patogênicos invasores podem entrar na glândula mamária. O teto contém músculos esfinterianos que mantêm o encerramento perfeito entre as ordenhas e impedem a penetração bacteriana, sendo que o aumento da permeabilidade do esfíncter está diretamente relacionado ao aumento da incidência de mastite. Adicionalmente, o canal do teto é revestido com queratina (epitélio estratificado pavimentoso), que é crucial para a manutenção da função de barreira do canal do teto. A perda da queratina tem sido correlacionada com o aumento da suscetibilidade para mastite. À medida que o parto se aproxima, ocorre uma considerável acumulação de líquido na glândula mamária bovina, causando aumento da pressão intramamária, ficando esta especialmente suscetível à mastite durante esse período, em parte devido à dilatação do canal do teto e ao extravasamento de secreções mamárias, que depois constituirão o colostro (Butler et al., 2015; Sordillo, 2018).

1.1.2. Defesas celulares

Se as bactérias forem capazes de superar a defesa anatómica fornecida pelo canal do teto, ainda assim deverão escapar à atividade antibacteriana da glândula mamária para estabelecer a doença. O número total e a atividade das populações de leucócitos da glândula mamária desempenham um papel precoce e vital na determinação da gravidade e duração das infecções intramamárias. Os neutrófilos são leucócitos inespecíficos que são recrutados ativamente para o local da infecção e são o principal tipo de célula encontrado nos tecidos e secreções mamárias durante a fase inicial da inflamação. Estas células inespecíficas viajam do sangue para a glândula mamária em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios, a fim de fagocitar e matar. Os neutrófilos são uma fonte de pequenos pep-

tídeos antibacterianos, as defensinas, que podem matar uma variedade de agentes patogénicos causadores de mastite (Bradford et al., 2015). Os macrófagos representam o tipo de célula dominante observado nos tecidos das glândulas mamárias lactantes saudáveis (Butler et al., 2015; Egyedy & Ametaj, 2022). Durante a patogénese bacteriana, os macrófagos podem servir para facilitar respostas imunes inatas ou adquiridas. O número de macrófagos mamários tende a ser menor durante a inflamação e possuem menos recetores Fc, possivelmente diminuindo sua taxa de fagocitose quando comparado com os neutrófilos (Silva et al., 2021). Os macrófagos ativados são desencadeados para libertar prostaglandinas, leucotrienos e citocinas que podem aumentar os processos inflamatórios locais. Os macrófagos também desempenham um papel importante no desenvolvimento de respostas imunes específicas através do processamento e apresentação de antígenos em associação com o MHC classe II. Alterações dramáticas nas capacidades funcionais dos neutrófilos da glândula mamária ocorrem durante o período periparto e têm sido diretamente associadas à incidência da doença (Silva et al., 2021). Esta disfunção dos neutrófilos pode dever-se à redução de produção de superóxido, fagocitose, expressão de moléculas de adesão à superfície celular e capacidade de migração (Crookenden et al., 2016). Os linfócitos são capazes de reconhecer antígenos através de recetores de membrana específicos que definem as características imunológicas de especificidade, diversidade, memória e reconhecimento próprio/não próprio. Subconjuntos de linfócitos são divididos em dois grupos principais: linfócitos T e B. Os linfócitos T podem ser classificados ainda em linfócitos T CD4+ (T auxiliares) e CD8+ (T citotóxicos ou supressores T). Durante a mastite, os linfócitos T CD4+ prevalecem e são ativados em resposta ao reconhecimento de complexos antígeno-MHC classe II em células apresentadoras de antígeno, como células B ou macrófagos. Os papéis imunorreguladores dos linfócitos CD8+ também dependem muito da fase de lactação. Células obtidas de bovinos leiteiros no meio da lactação exibiram atividade citotóxica e expressaram principalmente IFN- γ , enquanto os linfócitos CD8+ obtidos durante o período pós-parto não exibiram atividade citotóxica e expressaram principalmente IL-4. A apresentação do antígeno processado leva à secreção de IL-2 (interleucina – 2) pelos linfócitos T, que por sua vez induzem a proliferação e diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas que produzem anticorpos ou células de memória. Ao contrário dos linfócitos T, as percentagens de linfócitos B permanecem bastante constantes entre as fases da lactação. As células natural killer (NK) são linfócitos grandes e granulares que possuem atividade citotóxica independente do MHC. As células NK ligam-se a células tumorais ou infetadas por vírus e desgranulam, secretando perforina que destrói a célula alvo por rutura da membrana. As células NK também são capazes de eliminar bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo muito importantes na prevenção de infeções mamárias (Butler et al., 2015).

1.1.3. Defesas Solúveis

Os fatores solúveis específicos e inatos representam uma importante linha de defesa dentro da glândula mamária que pode provocar respostas protetoras eficazes contra agentes patogênicos invasores. Os principais fatores solúveis da resposta imune específica são anticorpos produzidos por linfócitos B ativados por antígenos. Existem quatro classes de Igs conhecidas por influenciarem os mecanismos de defesa bacteriana da glândula mamária: IgG1, IgG2, IgA e IgM. No geral, as Igs atingem o seu pico de concentração nas secreções mamárias durante a colostrogênese e durante a inflamação. A IgG1 é o isotipo primário encontrado em secreções mamárias saudáveis, sendo que a quantidade de IgG2 aumenta substancialmente durante a inflamação da glândula mamária. Vários isotipos (IgG1, IgG2 e IgM) podem atuar como opsoninas para aumentar a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Pelo contrário, a IgA não auxilia na opsonização bacteriana, mas funciona na aglutinação de bactérias invasoras que podem prevenir a propagação de doenças bacterianas na glândula mamária. Além dos efeitos específicos dos anticorpos, a glândula mamária possui fatores bacteriostáticos inespecíficos que atuam em conjunto ou independentemente das imunoglobulinas. Um desses fatores é a lactoferrina, uma proteína de ligação ao ferro produzida pelas células epiteliais e pelos leucócitos que funciona ligando-se aos íons férricos livres no leite, prevenindo assim o crescimento de bactérias que necessitam de ferro para crescer (Butler et al., 2015; Sordillo, 2018).

Tabela 2: Imunoglobulinas nas secreções lácteas dos bovinos

Imunoglobulinas nas secreções lácteas dos bovinos (concentração em mg/ml)			
Imunoglobulinas	Colostro	Leite maduro	Soro
IgG1	46.4	0.58	11.2
IgG2	2.87	0.05	9.2
IgA	5.36	0.10	0.37
IgM	6.77	0.09	3.1

Fonte: (Butler et al., 2015)

O complemento é um conjunto de proteínas presentes no soro e no leite que podem influenciar tanto a imunidade inata quanto a adquirida. As proteínas que compõem o sistema complemento são sintetizadas principalmente pelos hepatócitos, mas também por outras células como monócitos e macrófagos teciduais. Muitas das atividades biológicas do complemento são mediadas por receptores de complemento localizados em diversas células. As funções do complemento incluem lise de bactérias, opsonização e atração de fagócitos para o local de ativação do complemento. A lisozima é uma proteína bactericida presente no leite e funciona clivando peptidoglicanos da parede celular de bactérias gram-positivas, bem como da membrana externa de bactérias gram-negativas. A enzima lactoperoxidase, na presença de tiocianato e peróxido de hidrogênio, é bacteriostática para bactérias gram-

positivas e gram-negativas. A mieloperoxidase produzida pelos neutrófilos é também bacteriostática e catalisa a oxidação do cloreto (Butler et al., 2015; Sordillo, 2018).

O manejo intenso do gado leiteiro pode afetar profundamente a imunidade da glândula mamária e a capacidade do hospedeiro de resistir à mastite. A glândula mamária é protegida por diversos mecanismos de defesa protetores anatômicos, celulares e solúveis, mas quando estes mecanismos falham as bactérias penetram com sucesso na abertura da extremidade do teto a inflamação instala-se na glândula mamária. Estratégias destinadas a melhorar o sistema imunológico da glândula mamária, como a imunomodulação e a detecção precoce, podem ajudar na capacidade da vaca de resistir à infecção (Sordillo, 2018).

1.2. Indústria leiteira

A indústria de laticínios nos países desenvolvidos passou por profundas mudanças nas últimas décadas. As pressões económicas, as inovações tecnológicas, as mudanças demográficas, as expectativas dos consumidores e um quadro regulamentar em constante evolução contribuíram para o ímpeto de mudanças na indústria global de laticínios. Estas mudanças tiveram, e provavelmente continuarão a ter, efeitos profundos na saúde e no bem-estar das vacas leiteiras e nas práticas e sistemas de gestão dos rebanhos leiteiros. O tamanho médio dos rebanhos leiteiros aumentou continuamente nas últimas décadas em todos os países desenvolvidos (Barkema et al., 2015). Ao mesmo tempo, o número de explorações leiteiras diminuiu na maioria dos países. Embora poucos estudos tenham avaliado criticamente os efeitos do tamanho do rebanho na saúde e no bem-estar animal, parece que o tamanho do rebanho não tem uma associação consistente e previsível com a saúde ou o bem-estar (Chapinal et al., 2014). No entanto, o aumento da produção de leite está frequentemente associado à diminuição da saúde das vacas leiteiras. Por exemplo, a incidência de mastite clínica, claudicação e outras doenças, pode aumentar em vacas leiteiras de maior produção. Os problemas na relação entre produtividade e doenças são comuns e provavelmente substanciais em muitos estudos, os problemas metabólicos, variáveis de adaptação e função imunológica intervêm nessa relação, dado que uma proporção substancial do aumento da produção de leite é atribuível à seleção genética (Koeck et al., 2014).

Os consumidores e os cidadãos têm interesses de longa data na segurança e qualidade dos produtos lácteos. Contudo, nas últimas décadas, existe um interesse crescente com o bem-estar das vacas que produzem leite e seus produtos associados. Os defensores dos animais têm defendido fortemente melhores práticas nas explorações agrícolas (Barkema et al., 2015).

Uma outra preocupação dos consumidores é a Resistência antimicrobiana (RAM), um importante perigo para a saúde pública (Prescott, 2014) e um dos pilares basilares do conceito Uma Saúde (One Health) (Pungartnik et al., 2023). As organizações médicas humanas culpam frequentemente as

indústrias pecuárias pelo aumento da RAM. Os bovinos leiteiros podem ser reservatórios de genes de resistência, por exemplo, aqueles associados à produção de β -lactamases de espectro estendido em Enterobactérias, que podem ser transferidos para humanos (Coppola et al., 2020). O diagnóstico dos agentes etiológicos da mastite é muitas vezes negligenciado, sendo os protocolos de tratamento aplicados de acordo com diretrizes veterinárias pré-definidas. A abordagem mais comum envolve o uso de antibióticos sistêmicos ou intramamários o mais rapidamente possível após a detecção da doença. Contudo, o uso recorrente de antibióticos tem impactos significativos que não devem ser subestimados. A exposição contínua das bactérias aos antibióticos pode criar uma pressão seletiva, favorecendo a sobrevivência e a proliferação de estirpes bacterianas resistentes. A administração sustentada de antibióticos em animais produtores de alimentos pode resultar em reservatórios de genes resistentes e em populações bacterianas resistentes. Estas populações podem, então, contribuir para a propagação da resistência a antibióticos em outras comunidades bacterianas, incluindo aquelas que infetam seres humanos, deste modo é altamente recomendada uma administração prudente de antibióticos no tratamento das mastites (Martins et al., 2022).

1.2.1. Tecnologia

A adoção de tecnologia nas explorações leiteiras está a aumentar expressivamente nos últimos anos, com implicações profundas na forma como os bovinos são alojados e geridos nas explorações leiteiras. A utilização da inovação no sector primário levou ao nascimento de um novo tipo de agricultura, a “agricultura de precisão”. A pecuária é uma das mais afetadas pela PLF, pois é possível obter maior rentabilidade (produção leiteira) associada a uma melhoria do bem-estar animal. Além disso, a adoção de técnicas de PLF permite produzir alimentos seguros e com impacto ambiental reduzido. Os resultados da investigação científica mostraram claramente que melhorar o bem-estar animal é uma ferramenta eficaz para aumentar os lucros, reduzindo os custos relacionados com uma má saúde animal. Além disso, os consumidores estão cada vez mais focados em comprar e até gastar mais em produtos de origem animal obtidos através da satisfação do bem-estar animal e da proteção do ambiente (Evangelista et al., 2021). Muitas tecnologias tornaram-se amplamente disponíveis, incluindo pedómetros ou monitores de atividade para detecção de cio, assim como sensores em linha para determinar a qualidade do leite e sua composição. Há um enorme potencial para muitas destas tecnologias melhorarem a saúde, bem-estar animal e o desempenho reprodutivo das vacas leiteiras, uma vez que estas ferramentas são objetivas, e têm sido frequentemente utilizadas para identificar animais que necessitam de cuidados de uma forma mais adequada do que é possível monitorizar com a simples observação humana (Chanvallon et al., 2014). A grande evolução na tecnologia de sensores a integração de dados de múltiplos sistemas e, em particular, a maior formação dos agricultores, dos seus colaboradores e

consultores, para usar dados derivados desses sensores, permitirão a melhoria do controlo da variabilidade animal, aumentando a rentabilidade da exploração (Evangelista et al., 2021). A tecnologia nas explorações leiteiras, está ainda no seu início e, embora tenha claramente um enorme potencial, é necessária muita investigação para refinar e melhorar as tecnologias e desenvolver algoritmos, assim como pontos de corte (*cutoff*) interpretativos validados e protocolos para ações úteis baseadas em dados. Mudanças nas práticas de produção que afetem a saúde e o bem-estar dos animais parecem inevitáveis, especialmente dadas as preocupações sociais. O grande desafio que a indústria leiteira enfrenta é equilibrar as decisões e práticas que podem proporcionar ganhos económicos a curto prazo, mas que também podem estar associadas a riscos a longo prazo em termos de sustentabilidade. A maior adoção de tecnologias permitirá que os agricultores tenham acesso a fontes de dados robustas, que podem ajudar a melhorar ainda mais a produção animal e controlar melhor a relação entre o custo da alimentação das vacas e o preço obtido pelo leite produzido, que está diretamente relacionado com a quantidade e qualidade do produto (Evangelista et al., 2021).

Nas últimas décadas o desenvolvimento do sector da produção pecuária tem sido um desafio. A qualidade passa a prevalecer sobre a quantidade. As exigências dos consumidores relativamente à segurança dos alimentos de origem animal, aos métodos aplicados pelo agricultor em relação ao bem-estar animal, ao ambiente e à qualidade, apresentam um impacto crescente. A produção de elevadas quantidades de leite de alta qualidade é um objetivo importante para todos os operadores envolvidos na cadeia de produção de leite. Pelo contrário, um leite de baixa qualidade vai afetar todos os segmentos da indústria de laticínios, resultando num leite com propriedades de fabrico reduzidas e obtenção de produtos lácteos com um prazo de validade também reduzido (Ribeiro Júnior et al., 2019).

Em Portugal a avaliação da qualidade do leite, ao nível da produção primária, rege-se pela Legislação Europeia, Regulamento (CE) n.º 853/2004, que estabelece dois critérios fundamentais, nomeadamente a Contagem de Células Somáticas (CCS) e a contagem em placas a 30°C, também referido como teor de germes totais (TGT) (Tabela 3).

A DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária), no âmbito das suas competências, é responsável pelo Plano de Controlo Oficial do Leite (PCOL). As amostras relativas às explorações são tomadas pelos operadores nos Locais de Recolha de Leite (LRL), sendo que as inconformidades analíticas destas amostras, designadamente as relativas à presença de células somáticas, germes totais e resíduos de antibióticos, são de comunicação obrigatória à DGAV. No entanto, a maioria das explorações aderem ao contraste leiteiro, que é um método de registo sistemático da produção leiteira que consiste na avaliação da quantidade e qualidade do leite produzido por cada animal da exploração, no decurso das sucessivas lactações, permitindo estimar a produção total de leite, gordura e proteína fornecendo ainda informações sobre contagem de células somáticas e ureia no leite, visando o suporte da gestão técnico-económica das explorações.

Tabela 3: Critérios de qualidade aplicáveis ao leite cru de vaca. Regulamento (CE) nº 853/2004

Contagem em placas a 30° C (por ml)	≤ 100 000 (*)
Contagem de células somáticas (por ml)	≤ 400 000 (**)

(*) Média geométrica constatada ao longo de um período de dois meses, com, pelo menos, duas colheitas mensais

(**) Média geométrica constatada ao longo de um período de três meses, com, pelo menos, uma colheita mensal, a não ser que autoridade competente especifique outra metodologia para atender às variações sazonais dos níveis de produção.

1.3. Contagem de células somáticas

As células somáticas são essencialmente células epiteliais secretoras de leite que foram eliminadas do revestimento da glândula mamária e glóbulos brancos (leucócitos) que entraram na leite em resposta a uma lesão ou infecção (Sumon *et al.*, 2020).

Estas células incluem 75% de leucócitos, ou seja, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eritrócitos, e 25% de células epiteliais. Os eritrócitos podem ser encontrados em concentrações que variam de 0 a $1,51 \times 10^6$ ml (Deshapriya *et al.*, 2019). As células epiteliais das glândulas mamárias normalmente são eliminadas e renovadas; porém, durante a infecção o seu número aumenta. Os glóbulos brancos servem como mecanismo de defesa para combater infecções e auxiliar na reparação dos tecidos danificados. Durante a inflamação/infecção (mastite), o maior aumento da CCS é devido ao influxo de neutrófilos no leite para combater a infecção, tendo sido estimado números superiores a 90% (Bruckmaier & Wellnitz, 2017). Os neutrófilos são os fagócitos móveis primários mais importantes dos mamíferos e desempenham um papel fundamental no início de uma resposta imune inata, inflamatória e específica. Com a invasão de agentes patogénicos, os neutrófilos migram do sangue para o leite e desenvolvem cascatas de reações incluindo mecanismos oxidativos e não oxidativos para destruir os agentes invasores presentes. Um aumento dramático na CCS do leite ocorre no caso de infecção intramamária. Este crescimento celular é resultado da transferência de glóbulos brancos do sangue para a glândula mamária. Ao mesmo tempo, as proporções entre os diferentes tipos de células somáticas mudam significativamente, com um aumento do número de PNM (polimorfonucleares) (Hogeveen *et al.*, 2021).

Durante a mastite, observa-se uma redução na síntese de caseína e de gordura no leite, o que resulta numa diminuição geral da qualidade e quantidade do leite cru. Verificou-se que a lipólise e a proteólise são significativamente mais elevadas no leite com elevada CCS em comparação com o leite com baixa CCS. Relativamente à qualidade do leite pasteurizado, o leite que provém de amostras com alta CCS apresenta uma qualidade inferior, com níveis mais elevados de ácidos gordos livres e de hidrólise da caseína, o que contribui para uma redução significativa da sua vida útil durante o armazenamento refrigerado pós-pasteurização (Deshapriya *et al.*, 2019). No que concerne à análise sensorial, os

leites pasteurizados com elevada CCS demonstram defeitos sensoriais acentuados após o armazenamento, como rancificação, amargor e adstringência. A degradação da qualidade sensorial do leite com alta CCS torna-se evidente entre os 14º e 21º dias, o que se atribui, provavelmente, aos níveis elevados de enzimas lipolíticas e proteolíticas. Conclui-se que elevadas CCS no leite cru têm um impacto negativo, tanto na qualidade inicial do leite, como na qualidade do produto final (leite Pasteurizado), comprometendo a sua vida útil e os seus atributos sensoriais durante o armazenamento. Estes fatores sublinham a importância do controlo da mastite e, consequentemente, da CCS, para garantir a produção de leite com elevada qualidade (Deshapriya *et al.*, 2019).

A Contagem de Células Somáticas é usada, principalmente como um indicador de saúde do úbere, no entanto, está a ser cada vez mais usada como uma medida indireta da qualidade do leite e como um parâmetro para determinar o valor económico do leite (Oravcova *et al.*, 2024). O aumento da CCS apesar ter como causa principal uma infeção/inflamação, não é exclusivamente influenciado por esta. Existem outros fatores não infecciosos que podem afetar a CCS, nomeadamente:

1.3.1. Nível de infeção da glândula mamária

O fator mais importante que afeta a CCS do leite de um quarto individual, depende do estado de infeção aí presente. O grau e a natureza da resposta celular são provavelmente proporcionais à gravidade da infeção (Alhussien & Dang, 2018).

1.3.2. Fase da lactação

O efeito do estágio de lactação é significativo para todas as faixas etárias de lactação (≥ 2 a ≤ 6) e as CCS são mais altas logo após o parto, diminuindo rapidamente para um nadir entre os dias 25 e 45 para depois aumentarem lentamente durante o resto do ciclo de lactação (Alhussien & Dang, 2018).

1.3.3. Idade/Raça

Vários investigadores relataram que a CCS aumenta com o aumento da idade, no entanto, este aumento pode dever-se a um aumento da prevalência de infeções em vacas mais velhas, e não devido a um efeito direto da idade aumento (Alhussien & Dang, 2018). Foi verificada uma variação da CCS entre raças de animais leiteiros, sendo que as raças de gado de alta produção, como Brown Suíço e Holandês Preto, apresentam maior presença de CCS/ml no leite (Sharma *et al.*, 2011).

1.3.4. Paridade/Temporada/Stress

A CCS do leite é afetada pela paridade, sendo que os primeiros partos apresentam CCS mais baixa (Alhussien & Dang, 2018). As CCS também são afetadas pela estação do ano, sendo geralmente mais baixas durante o Inverno e mais altas durante o verão, devido ao maior número de bactérias ambientais no material de cama dos animais (Oravcova *et al.*, 2024).

O Stress é outro dos fatores com influência na CCS. Os radicais livres são produzidos em sistemas biológicos como resultado de vários fatores de stress, incluindo as técnicas de ordenha, condições

ambientais e infecções. Quando um animal enfrenta stress, como durante práticas inadequadas de ordenha ou devido a alterações ambientais e lesões nos tetos causadas por organismos infecciosos, a produção de radicais livres aumenta. O stress oxidativo causado por esses radicais provoca danos celulares, inflamação afetando a saúde no animal afetado (Sharma *et al.*, 2011).

1.3.5. Variação diária

Em geral, a CCS é mais baixa imediatamente antes da ordenha e aumenta rapidamente na extração, podendo persistir elevada até 4 horas após a ordenha e depois diminuir gradualmente. Esta amplitude da CCS (diferença entre os valores mais altos e baixos) varia de 4 a 70 vezes em trimestres individuais. A variação diária nas contagens de células também já foi investigada e revelou que a CCS pode flutuar para um valor superior a 40% sem que esteja presente qualquer infecção (Sharma *et al.*, 2011).

1.3.6. Fatores genéticos

Embora estudos sobre a hereditariedade da CCS sejam ainda escassos, existe uma variação genética significativa, sugerindo que se conseguem para melhorias na CCS através da seleção genética (Alhussien & Dang, 2018).

1.3.7. Processos de amostragem

A técnica de amostragem também é importante. A colheita no tanque a granel é crucial para os resultados obtidos, sendo necessária uma agitação suficiente do leite para garantir que a amostra colhida é homogênea e representativa (Djabri *et al.*, 2002).

A produção de leite de alta qualidade é um requisito para sustentar uma indústria de laticínios lucrativa. A inflamação da glândula mamária bovina, é caracterizada por um recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o lúmen do úbere. Essa migração origina um aumento da CCS. Por esta simples razão, a CCS é utilizada internacionalmente como parâmetro fundamental para o manejo da saúde do úbere em rebanhos leiteiros e definir padrões de qualidade em países desenvolvidos. No entanto, como foi atrás referido o valor informativo do CCS é limitado, pelo fato de que pode ser afetado por outros fatores (Bausewein *et al.*, 2022; Oravcova *et al.*, 2024). Assim, a combinação de métodos de diagnóstico torna-se imperativa no manejo da mastite, assim como a utilização de métodos economicamente acessíveis e aplicáveis ao campo para um diagnóstico mais precoce, rápido e preciso desta doença (Dasohari, 2018).

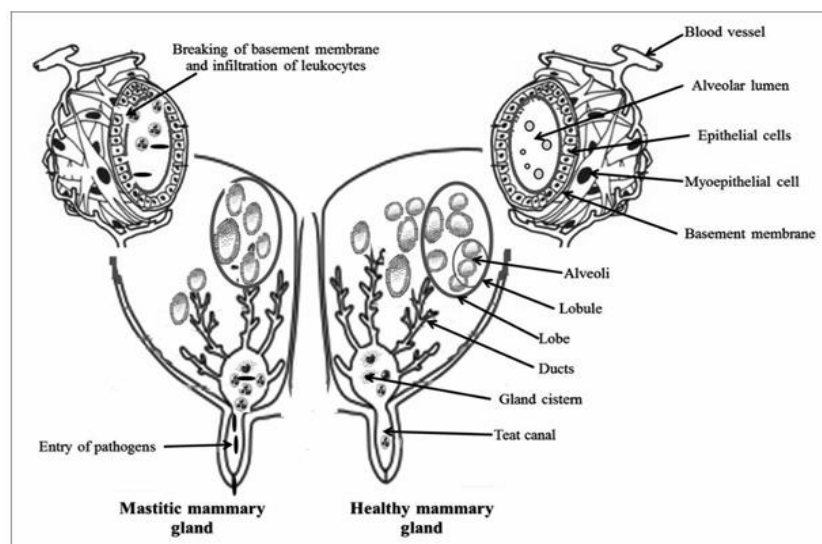


Figura 1 - Representação esquemática mostrando glândula mamária saudável e com mastite

Fonte: Alhussien e Dang

1.4. Hemograma

A análise hematológica não é apenas relevante para o diagnóstico de alterações do sistema sanguíneo, mas também útil no diagnóstico de diversas doenças sistêmicas, com sede em diversos órgãos. Embora o diagnóstico de uma patologia não possa ser baseado unicamente numa contagem completa de células sanguíneas (*complete blood count*, CBC), o hemograma pode fornecer informações valiosas quer para o diagnóstico, monitorização, assim como para a formulação de um prognóstico sobre a progressão futura de uma doença num determinado animal. Assim, a interpretação do CBC no contexto de cada animal é fundamental (Roland *et al.*, 2014). Em bovinos, importa referir que existe uma ampla variabilidade no que diz respeito às raças e aptidões (e.g., bovinos de leite e bovinos de corte) que se refletem nos parâmetros hematológicos. Assim, em geral, as raças de gado de corte apresentam contagens de eritrócitos mais elevadas do que o gado leiteiro. Principalmente pelos custos associados a análise de sangue não é uma prática corrente na clínica de animais de produção. As co-lheitas de sangue prendem-se mais com rastreios de doenças, no âmbito da sanidade animal. No entanto, as indicações mais comuns para CBC a nível da linhagem eritrocitária são a anemia e as hemorragias. Entretanto a análise do sangue deve ser feita em equipamentos de veterinária. O pequeno tamanho dos eritrócitos dos ruminantes pode resultar em valores falsamente baixos para as contagens de eritrócitos se os analisadores automáticos não estiverem calibrados corretamente para estes animais (Roland *et al.*, 2014).

Os glóbulos brancos (WBCs) ou leucócitos têm um papel essencial na defesa imunológica e incluem os: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Os leucócitos são produzidos e amadurecem na medula óssea, sendo os linfócitos a população dominante em bovinos. A proporção

de neutrófilos para linfócitos em bovinos adultos é de aproximadamente 1:2, o que é baixo em comparação com outros animais domésticos ou com o homem (Braun *et al.*, 2021). Uma outra diferença em bovinos prende-se com a pequena reserva de medula óssea para granulócitos para a resposta a uma infeção (o chamado compartimento medular). Isto resulta, inicialmente, numa neutropenia em vez da habitual neutrofilia nas primeiras 24-48 horas após o início da inflamação aguda. A neutrofilia e desvio à esquerda podem ser observados apenas após um aumento da velocidade da granulocitopoiese. Entretanto, existem também variações na contagem e proporções de leucócitos em várias situações. Os números de neutrófilos, por exemplo diminuem no período pós-parto, e as vacas lactantes apresentam contagens de leucócitos significativamente mais baixas do que as vacas não lactantes. As indicações para um CBC a nível da linhagem de leucócitos incluem, avaliações gerais de saúde, monitorização de uma doença ou monitorização de ações terapêuticas. No entanto, importa destacar que raramente é possível estabelecer um diagnóstico definitivo com base apenas na contagem de leucócitos. Tal como em pequenos animais, leucogramas sequenciais têm muito mais relevância do que análises únicas e podem ajudar a estabelecer um prognóstico. O retorno do leucograma a valores normais, juntamente com a melhoria clínica do animal, pode ser interpretado como um sinal favorável, enquanto uma queda rápida na contagem de leucócitos sem melhoria clínica é considerada um sinal prognóstico grave (Braun *et al.*, 2021).

No âmbito das mastites vários estudos demonstraram existir uma correlação positiva entre contagem de leucócitos no sangue e CCS (Alhussien & Dang, 2018; Carvalho-Sombra *et al.*, 2021). Assim a análise de parâmetros sanguíneos associados à análise do leite, pode contribuir para o diagnóstico de mastite subclínica no rebanho, fornecendo informações adicionais ao diagnóstico desta doença. (Alhussien *et al.*, 2015; Carvalho-Sombra *et al.*, 2021).

Importa referir que a microscopia, impedância e a citometria de fluxo são os métodos padrão tanto para a CCS como para a análise do hemograma. Estes métodos, dependem de instrumentos de grande escala, que são geralmente caros, volumosos e disponíveis apenas em laboratórios centrais, e habitualmente requerem pessoal especializado (Martins *et al.*, 2019). Assim, para o contexto da PLF há uma necessidade urgente de um ensaio preciso, portátil, barato, simples de usar e de rápida aplicação no local de atendimento. Um aparelho de campo (*Point of care*, POC) poderia agilizar a recolha de dados no campo, contribuindo assim para um diagnóstico mais célere.

1.5. Marcadores Indicativos de Mastite

O fardo económico da mastite e o seu impacto negativo na qualidade do leite (alterações nas propriedades químicas e organoléticas) são bem conhecidos pelos produtores de lacticínios e por todos os intervenientes na cadeia de valor deste produto. Neste sentido, tem sido dada atenção à deteção

precisa e à prevenção da mastite, e uma infinidade de testes e tecnologias estão atualmente disponíveis ou em desenvolvimento, para detetar a doença o mais rápido possível (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo dos métodos diagnósticos para marcadores de mastite

Princípio	Teste	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Comentários
Avaliação de células somáticas	Microscopia laboratorial	Observação direta por microscopia do leite	Inspeção visual e direta das células	Demorado Pessoal especializado	Disponível em laboratórios
	DeLaval™ cell count	Corante fluorescente é usado para corar os núcleos das células Técnica de imagem	Rápido portátil Contagem no tanque ou individual	Investimento no equipamento	Disponível comercialmente
	Fossomatic™ cell count	Marcação fluorescente de células somáticas com brometo de etídio para coloração ADN, citometria de fluxo	Automatizado Alto rendimento	Investimento no equipamento, Pessoal especializado, Uso laboratorial	Disponível comercialmente
	Qscout™	Coloração diferencial de células somáticas por imagem	Rápido Portátil Coloração diferencial aumenta sensibilidade e especificidade	Requer mais validação Investimento no equipamento	Disponível comercialmente
	Septer™	Deteta e conta pelo método coulter	Dispositivo portátil	Requer mais validação	Disponível comercialmente
	Teste californiano (CMT)	Indicador indireto para estimar células somáticas no leite, reagente reage com DNA das células formando um gel	Teste no local Rápido Custo-benefício Simples de usar	Difícil de interpretar Sensibilidade dependente do agente causador de infeção	Disponível comercialmente
	Portascctm	Mede a atividade da enzima esterase presente nos leucócitos	Custo-benefício Teste no local Rápido Simples de usar	Desempenho inferior quando comparado com outros testes de CCS	Disponível comercialmente
Deteção atividade enzimática	UdderCheck™	Mede a DHL Colorimétrico	Teste no local Rápido	Inferior desempenho Comparado com CCS	Disponível comercialmente
Deteção de proteínas	Ringbio™	Marcador proteína Colorimétrico	Teste no local Rápido		Disponível comercialmente
Condutividade elétrica	Mick checker™	Condutividade anormal	Rápido Teste no local	Baixa sensibilidade comparado com CCS	Disponível comercialmente Compatíveis com Robôs de ordenha automática
Medidores PH	Vários	Colorimétrico Eléktrodo bromotimol para medir concentrações de iões	Custo-benefício Teste no local	Baixa sensibilidade diagnóstica	Disponível comercialmente Adaptável a alguns sistemas de ordenha automática

Tabela 4: Resumo dos métodos diagnósticos para marcadores de mastite (continuação)

Princípio	Teste	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Comentários
Biossensores					
Dispositivos analíticos com biossensores capazes de detectar moléculas biológicas numa amostra	(Pemberton et al., 2001)	Ensaio eletroquímico Elétrodos de carbono impressos com substratos NAGase	Reação em 100s	Não testado com amostras reais Configuração laboratorial	O pH do tampão, foi ajustado para líquidos biológicos
	(Welbeck et al., 2011)	Imunoensaio competitivo. Amostras de leite pasteurizado enriquecidas com concentrações conhecidas de Enzima NAGase	Chip reutilizável Reprodutível Limite de detecção: 10 U/mL	Não testado com amostras reais Configuração laboratorial	Requer desenvolvimento adicional
	(Akerstedt et al., 2006)	Sensor com afinidade para detectar interações entre haptoglobina e hemoglobina no leite	Limite de detecção: 1,1 mg/L - leite Capacidade de detectar Haptoglobina 24/28 amostras	Requer pré-tratamento da amostra Configuração laboratorial	Requer desenvolvimento adicional
	(Tan et al., 2012)	Imunoensaio eletroquímico com anticorpos anti-haptoglobina – amostras de leite	Portátil Limite de detecção 0.63 mg/L	Requer pré-tratamento da amostra	Requer desenvolvimento adicional
Dispositivos de lab-on-chips					
Sistemas analíticos integrados capazes de realizar diferentes testes laboratoriais num único dispositivo	(Grenvall et al., 2012)	Acustoforese em chip microfluídico que separa células somáticas de gordura, realizado por microscopia de contraste de fase	Não há pré-tratamento da amostra ou adição de reagentes Micro amostra Unidade de tratamento	Requer microscopia para análise das células	Precisão comparada ao método padrão
	(Garcia-Cordero et al., 2010)	Sedimentação microfluídica avaliando diferenças entre gordura e células	Portátil Mede 12 amostras simultaneamente Não há pré-tratamento da amostra ou adição de reagentes	Contagem indireta de células somáticas baseado no volume do pellet Resultados em 15 minutos	Foi desenvolvido um protótipo portátil
	(Kim et al., 2017)	Sistema microfluídico combinado com microscopia fluorescente portátil	Automatizado e portátil Resultados em 10 minutos	Ainda não testado com amostras reais	

Fonte: (Martins et al., 2019)

2. ESPECTROSCOPIA

Espectroscopia é o termo geral que descreve a ciência que estuda as interações de vários tipos de radiação com a matéria, ou seja, as interações entre partículas como elétrons, prótons e íons, e a sua interação com outras partículas em função da sua energia de colisão. Os investigadores usam as interações da radiação com a matéria para obter informações sobre uma amostra. Muitos dos elementos químicos, por exemplo foram descobertos por espectroscopia. A espectroscopia é usada principalmente para identificar elementos e compostos de átomos e moléculas. Estes são medidos analisando a energia radiante absorvida ou emitida pela amostra ou objeto, ou seja, a energia do fóton absorvido ou emitido corresponde à diferença nos níveis de energia antes e depois da transição. Para recolher informações sobre o analito, a radiação eletromagnética emitida é medida quando os átomos retornam ao seu estado fundamental ou a quantidade de radiação absorvida ou espalhada durante o processo de excitação (Skoog *et al.*, 2017).

Normalmente, as amostras são submetidas a estimulação usando diferentes formas de energia, como calor, eletricidade, luz, partículas ou reações químicas. Inicialmente os átomos na amostra estão no seu estado de energia mais baixo, quando estimulados, absorvem ou emitem um fóton de radiação eletromagnética, fazendo com que eles transitem para um nível de energia específica. A energia do fóton absorvida ou emitida corresponde à diferença nos níveis de energia antes e depois da transição. Para obter informações sobre a amostra, ou seja, a radiação eletromagnética emitida quando os átomos retornam ao seu estado fundamental ou a quantidade de radiação absorvida ou espalhada durante o processo de excitação, pode ser medido (Skoog *et al.*, 2017).

2.1. Espectroscopia UV-Visível

A espectroscopia UV-Visível (Vis), baseia-se em medidas de absorção da radiação eletromagnética nas regiões visível e ultravioleta do espectro. Mede a quantidade de luz absorvida pela amostra e relaciona a mesma com a concentração do analito. É um método analítico adequado para uma ampla gama de compostos orgânicos e certas espécies inorgânicas. Os espectrofotômetros UV-Vis medem a absorvância (A) ou transmitância (T) da luz à medida que ela passa através de uma substância, correlacionando-a com o comprimento de onda. Esta técnica é baseada nas transições eletrônicas de moléculas orgânicas, quando absorvem luz, excitam elétrons de um orbital de energia mais baixa para um orbital desocupada de maior energia. A lei Lambert-Beer (BLL) descreve efetivamente a conexão entre absorvância e concentração para a maioria dos compostos (Rocha *et al.*, 2018).

2.2. Espectroscopia infravermelho

A região infravermelha (IR) varia de 800 nm a 1 mm no espectro de luz. Devido ao seu extenso tamanho, é impraticável tratar toda a região uniformemente em espectroscopia. Portanto, é categorizado em três regiões: IR próximo (NIR), IR médio (MIR) e IR distante (FIR) do visível. A espectroscopia NIR distingue-se pela presença de sinais fracos ou bandas estreitas na sua faixa espectral, diferenciando-a de outras regiões, esta singularidade é particularmente valiosa porque a região NIR serve como janela exclusiva de alta transmissão para radiação (Zeng *et al.*, 2021).

Ao longo dos anos, as questões de contaminação microbiana e adulteração deliberada de leite e produtos lácteos têm sido uma grande preocupação para as partes interessadas na indústria láctea. Novos métodos vieram complementar ou substituir os métodos existentes na avaliação do leite e produtos lácteos. Um desses avanços é a espectroscopia NIR. A aplicação do NIR na indústria de laticínios trouxe melhorias significativas na análise e avaliação nutricional, proporcionando um exame rápido e económico (Yakubu *et al.*, 2022).

Produtos biológicos, quando expostos à luz NIR, apresentam um espectro de absorção característico nessa região, que é resultado dos vários constituintes químicos e estruturas físicas do produto. A absorção de luz NIR é causada principalmente pelas ligações químicas relacionadas ao hidrogénio (como CH, OH, NH, SH em amostras biológicas), mas devido a muitos fatores de influência (por exemplo, diferentes conformações moleculares, picos de absorção sobrepostos, dispersão de luz), não há interpretação direta de um espectro NIR registado com base no comprimento de onda (ou número de onda) e na absorvância relacionada (Yakubu *et al.*, 2022).

2.3. Recolha de espectros em amostras

Como não é possível uma interpretação direta dos espectros, é necessária uma colheita de espectros representativos, com os quais os espectros de um material de teste possam ser comparados, para estabelecer a sua qualidade ou autenticidade. Consequentemente, o Vis-NIR é uma medição correlativa e indireta, que na maioria das aplicações precisa de ser calibrada em relação a um método de referência. A abordagem usual processa-se em quatro etapas: primeiro obtém-se dados espectrais de medições de referência para muitas amostras (conjunto de dados de treino). Em segundo lugar usa-se esse conjunto de dados para estabelecer uma fórmula que preveja a referência a partir de dados espectrais. Seguidamente faz-se uma validação da fórmula em amostras adicionais e, finalmente, aplica-se o modelo validado em amostras independentes. Um conjunto de amostras contendo dados de referência e dados espectrais pode ser utilizado para treinar modelos multivariados e construir calibrações quantitativas ou classificações qualitativas. A análise multivariada de dados (MVDA), permite a

avaliação de dados espectrais colineares, contendo centenas ou milhares de variáveis, convertendo-os matematicamente em informações quantitativas ou qualitativas precisas da natureza química e física das amostras investigadas. Os pré-tratamentos espectrais são geralmente usados para reduzir ruído instrumental, efeitos de distorção de sinal da preparação e apresentação da amostra ou quaisquer outros efeitos decorrentes do espectrómetro, da amostra e do ambiente. Durante o processo de análise de dados, a natureza dos conjuntos de dados e os objetivos do estudo determinarão a forma de pré-processamento dos dados e as técnicas quimiométricas multivariadas necessárias (Yakubu *et al.*, 2022).

Depois de uma equação de calibração ser desenhada, é essencial determinar a sua capacidade de prever as variáveis preocupantes, para amostras novas e desconhecidas. Também, devem ser escolhidos entre os métodos de calibração alternativos, e decidir quais as configurações exatas de pré-tratamento dos dados de treino e do modelo a usar. A precisão preditiva e exatidão dos modelos de calibração são demonstradas principalmente com o correlação de Pearson (R) e o erro percentual absoluto médio (MAQPE), respetivamente, e cada um pode ser calculado para a calibração em si e para a validação (Yakubu *et al.*, 2022).

Tabela 5: Resumo comparativo de estudos representativos da capacidade de previsão da espectroscopia NIR nos parâmetros da qualidade do leite

Produto	N	Parâmetro	R ² cv	SECV	Pré-tratamento espectral	Multivariada modelo	Tecnologia de espectrómetro	Referência
Leite bovino	258	Gordura (%)	0,99	0,25	1ª Derivada -SG	PLSR 10 Fatores	Bancada Detetores de PbS, 400-2500nm Transmissão	(Tsenkova, 2009)
		Proteína (%)	0,67	0,17				
		Lactose (%)	0,85	0,09				
	250	n-6 (g/100g)	0,58	0,38	SNV, 2ª Derivada	MPLRS	Bancada Detetores de PbS, 400-2500nm Transmissão	(Coppa et al., 2014)
		n-3 (g/100g)	0,84	0,18				
		PUFAs (g/100g)	0,84	0,46				
		MUFAs (g/100g)	0,87	1,06				
		Total CLAs (g/100g)	0,86	0,21				
	60	Tetraciclina (ppb)	0,87	110	1ª Derivada	PLSR, 4 Fatores	Bancada Detetores de DTGS, 1250-22857 nm Transmissão	(Sivakesava & Irudayaraj, 2002)

Tabela 5: Resumo comparativo de estudos representativos da capacidade de previsão da espectroscopia NIR nos parâmetros da qualidade do leite (continuação)

Produto	N	Parâmetro	R2cv	SECV	Pré-tratamento espectral	Multivariada modelo	Tecnologia de espectrômetro	Referência
Leite	52	Coagulação (%)	0,87	0,36	Nenhum	MPLSR, 11 Fatores	Bancada Detetores de PbS, 400-2500 nm	(Laporte & Paquin, 1999)
	NIRS on-line	Gordura	0,95	0,25	Nenhum	PLSR, 10 Fatores	Transmissão Sistema de detecção NIRS em linha, durante a ordenha 600-1050nm	(Kawasaki et al., 2008)
		Lactose (%)	0,83	0,26	Nenhum	PLSR, 10 Fatores		
		Proteína (%)	0,72	0,15	Nenhum	PLSR, 12 Fatores		
		CCS (logSCC/ml)	0,68	0,28	Nenhum	PLSR, 13 Fatores		
		NUM (mg/dl)	0,53	1,50	Nenhum	PLSR, 8 Fatores		
	81	Gordura Total (%)	0,90	0,07	Nenhum	PLSR ativado	NIRS portátil 800-1060nm, Transmissão e espalhamento	(Kalinin et al., 2013)
		Caseína (%)	0,88	0,12	Nenhum	Combinação de espectros		
		Proteínas soro do leite (%)	0,94	0,06	Nenhum			
	542	Gordura (%)	0,96	0,10	SNV, 2ª Derivada	MPLSR	Detetor portátil 1600-2400 nm, refletância	(de la Roza-Delgado et al., 2017)
		Proteína (%)	0,68	0,13				
		SNF (%)	0,48	0,22				
	108	Mufas (g/100g)	0,86	3,56	SNV, 2ª derivada	PLSR, 7 fatores	Detetor portátil 1600-2400 nm, refletância	(Suárez et al., 2018)
		Pufas (g/100g)	0,82	0,72	SNV, 2ª derivada	PLSR, 5 fatores		

N, número de amostras; R2cv, coeficiente de determinação da validação cruzada; SECV, erro padrão de validação cruzada; SNV, variável normal padrão; PLSR, regressão parcial dos mínimos quadrados; MPLSR, PLSR modificado; PbS, Sulfureto de chumbo; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; n-3, PUFA ômega-3; n-6 PUFA ômega 6; CCS, contagem de células somáticas; MUN, nitrogénio ureico do leite.

Fonte: (Yakubu *et al.*, 2022)

2.4. Tecnologia POC “MyVet”

O sistema MyVet é um dispositivo POC sem reagentes, destinado à realização de testes laboratoriais clínicos próximos ao local onde são prestados os cuidados ou tratamentos ao doente. Por outras palavras, trata-se de um sistema POC, que permite a realização de análises de forma rápida e direta, no local onde o indivíduo se encontra, facilitando a obtenção imediata de resultados e a subsequente tomada de decisões clínicas em tempo real. Esta tecnologia utiliza espectroscopia Vis-NIR, que mede com uma única gota de amostra, constituintes do leite e do sangue. Foi previamente testado para sangue humano, de gato e de cão (Barroso *et al.*, 2021). O equipamento consiste num POC de alta resolução adaptável a um telemóvel (Barroso *et al.*, 2022).

Convém referir que a espectroscopia visível de ondas curtas no infravermelho próximo (Vis-NIR) é uma tecnologia rica em informações físicas e químicas, no contexto do sangue as informações relativas às células sanguíneas e seus constituintes são distribuídas pelos diferentes comprimentos de onda (Zhou *et al.*, 2021). Contudo, os espectros sanguíneos apresentam-se compostos por interferências multiescala e efeitos de matriz, sobrepondo informações físicas (relacionadas por exemplo com o espalhamento) e químicas (absorvância dos diversos elementos constituintes). Decifrar as informações contidas nos dados espectrais, face à interferência multiescala, constitui o maior desafio para as tecnologias POC. A interferência multiescala resulta da sobreposição de bandas espectrais dos constituintes do sangue, provocando interferências em intensidades variadas e desvios à BLL (Pasquini, 2018).

Os efeitos de matriz são inerentes às propriedades da amostra, como efeitos de pH ou espalhamento, que afetam as proporções de espalhamento de Mie e Rayleigh, bem como as bandas de absorção (Olinger & Griffiths, 1988; Sparén *et al.*, 2015). A química clínica e analítica aborda a interferência espectral através da simplificação da composição da amostra (por exemplo, separação por filtração, centrifugação, cromatografia), não aproveitando, assim, a rica informação presente nos espectros (Popov *et al.*, 2023).

Desembaralhar a interferência em múltiplas escalas e os efeitos de matriz, bem como desbloquear informações específicas dos constituintes em cada espectro, é fundamental para a tecnologia POC sem reagentes (Barroso *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2022; Monteiro-Silva *et al.*, 2019). A combinação de processamento de sinais, quimiometria e inteligência artificial está a aprimorar a precisão das tecnologias existentes, permitindo correções de sinais e reconhecimento de padrões que quantificam e diagnosticam condições clínicas, resolvendo as interferências multiescala e os efeitos de matriz na espectroscopia (Martins *et al.*, 2022; Monteiro-Silva *et al.*, 2019).

A informação dominante nos espectros sanguíneos é atribuída a constituintes altamente absorventes na região Vis-NIR, tais como: hemoglobina (Hgb) (Meng & Alayash, 2017) e a bilirrubina (Bil) (Tan *et al.*, 2020). Os eritrócitos (RBC) são as células predominantes, e a Hgb domina os espectros de

3.1. Caraterização da Amostra

O presente relatório descreve o estágio em investigação clínica laboratorial, realizado ao longo de aproximadamente seis meses, de março a agosto de 2024, em que foi estudada uma população de vacas leiteiras em seis explorações situadas na bacia leiteira entre o Douro e o Minho (Figura 2). Durante este período, o objetivo foi o de avaliar e validar diversos parâmetros analíticos no leite de vaca e no sangue bovino.

3.2. Implementação do método analítico

Os aparelhos de Vis-NIR necessitam de uma calibração prévia, como é normal para a maioria dos equipamentos de medição. No entanto, estabelecer correlações nestes equipamentos não é simples, dado que os espectros obtidos são complexos e sujeitos a variações externas. Como explicado atrás, os espectros de absorção Vis-NIR apresentam geralmente uma estrutura complexa, com uma ampla sobreposição de bandas. Ao analisar várias amostras numa série, pequenas diferenças entre elas podem originar muito subtis variações espectrais. Isto significa que os dados de absorção de Vis-NIR obtidos dependem simultaneamente de múltiplas variáveis. Por conseguinte, é necessário um conjunto de amostras que contenha dados de referência obtidos por métodos padrão (i.e., convencionais) e dados espectrais, a fim de treinar modelos multivariados e construir calibrações quantitativas (Yakubu *et al.*, 2022).

As amostras devem ser representativas da variabilidade do processo para garantir a obtenção de resultados robustos. Nos modelos quantitativos, é essencial que as amostras cubram a gama desejada para o parâmetro a quantificar. Foram recolhidas as seguintes amostras:

Leite

Foram recolhidas 404 amostras de leite durante a ordenha, utilizando tubos secos para análise por espectrometria e tubos com conservante para análise do contraste leiteiro (avaliação da quantidade e qualidade do leite produzido por cada fêmea na exploração ao longo das sucessivas lactações). Os espectros do leite foram registados utilizando um protótipo POC (INESC TEC, Porto, Portugal) equipado com uma fonte de luz LED de 4500 K e um espectrómetro miniaturizado baseado em USB (Ocean Insight STS-vis, Orlando, FL, EUA). A temperatura do LED e os tempos de integração do espectrómetro foram calculados automaticamente para garantir a consistência dos resultados. Para cada amostra de leite, foram efetuadas três medições repetidas. Já o contraste leiteiro foi realizado no laboratório ALIP usando o método padronizado de citometria de fluxo (FC Fossomatic™, Foss Instruments, Hillerød, Dinamarca) para determinar a CCS e usando o NIR DS 2500® (Foss Instruments), através do método de

espectroscopia no infravermelho próximo do visível, também designada de FTIR (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*), para a avaliação das concentrações de gordura, proteínas e ureia no leite.

Sangue total

Foram colhidas 204 amostras de sangue em tubos com anticoagulante EDTA, pelo médico veterinário, através de punção da veia coccígea na base da cauda, nos mesmos animais e no mesmo dia em que foram recolhidas as amostras de leite (colheita subsequente à ordenha). Os espectros destas amostras foram registados utilizando o mesmo protótipo POC usado para o leite, tendo-se realizado três medições repetidas para cada amostra. Relativamente ao método de referência, foi usado um contador automático ADVIA® 2120 (Siemens AG, Erlangen, Germany) no Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS. Este aparelho baseia-se no método de citometria de fluxo, usando também a lise e avaliação da peroxidase para a obtenção do diferencial. Este aparelho foi calibrado diariamente (*Test point 3 in 1*, Siemens AG), estando validado para utilização em bovinos (Roland *et al.*, 2013). Foram realizados esfregaços de sangue para confirmação dos diferenciais fornecidos pelo aparelho. O resumo da amostragem efetuada ilustrada na Figura 3.



Figura 3-Colheita e processamento de amostras de sangue e leite; no QR code pode ver-se o aparelho em funcionamento

3.3. Quantificação Espectral

Uma vez obtidos os espectros e determinados os valores pelos métodos de referência, procedeu-se à determinação da equação de regressão que estabelece a melhor correlação entre ambos. Para isso, são utilizadas técnicas de quimiometria e inteligência artificial, que permitem realizar correções de sinais e reconhecimento de padrões, essenciais para a quantificação e diagnóstico de condições clínicas. Essas técnicas possibilitam a resolução de informações multiescala e a mitigação de efeitos de matriz na espectroscopia (Martins *et al.*, 2022).

Neste estudo, os registos espectrais foram submetidos a correções de espalhamento (Scattering Correction) antes da modelagem. Em seguida, foi aplicado o método SLAI (Inteligência Artificial de Autoaprendizagem), cujo princípio fundamental consiste na busca por uma covariância sistemática e estável entre a composição da amostra e as suas características espectrais (Martins *et al.*, 2022). A covariância estável tem uma relação direta com o BLL (estabelece uma relação entre a absorvância/ transmitância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada) e o SLAI, utilizando essa relação para decifrar a complexa interferência multiescala entre os constituintes do sangue, permitindo a quantificação de RBC, Hgb, HTC, WBC.

O método SLAI foca-se na identificação de covariância estável em conjuntos de dados espectrais, determinando modos de covariância (COVM). Esta COVM refere-se a um grupo de amostras que compartilham as mesmas características de interferência, mantendo uma proporcionalidade entre os analitos estudados e as suas características espectrais. Idealmente, a relação entre cada analito e as características espectrais é representada por um único autovetor ou variável latente (LV). Este processo é realizado em duas etapas distintas:

1. A otimização do espaço de características: a informação sobre um constituinte está presente nos espectros em diferentes escalas e comprimentos de onda. A seleção correta das características e transformações por exemplo, decomposição em valores singulares, (transformadas de Fourier ou *Wavelets*) é essencial para extrair a informação para um espaço de características que mantenha proporcionalidade com a concentração dos constituintes;
2. Busca no modo de covariância: Este passo envolve a procura de um grupo de amostras dentro do espaço de características que partilham o mesmo padrão de interferência, ou seja, uma mistura gradiente de interferentes, onde a informação é proporcional à concentração do constituinte. Isto significa que as características espectrais X contêm as mesmas informações da composição Y , com uma covariância estável $X'Y$.

3.4. Validação

Após a construção do modelo de calibração, é fundamental testar a sua capacidade preditiva. Para isso, um novo conjunto de amostras é analisado tanto pelo método de referência quanto pelo VIS-NIR. Essas novas amostras são processadas sob as mesmas condições que as do conjunto de treino. Uma vez traçado o espectro, o equipamento Vis-NIR utiliza o modelo de calibração para calcular o resultado (valor previsto). As respostas obtidas são então avaliadas em termos de reprodutibilidade e precisão.

O desempenho do método foi avaliado através do cálculo do erro percentual médio absoluto (MAPE) e da correlação de Pearson (R), esta última utilizada como métrica de linearidade entre os valores previstos e os valores medidos.

4. RESULTADOS

4.1. Espectroscopia do Leite/ FC Fossomatic™, NIR DS 2500®

O espectro UV-VIS apresenta uma forte absorção nos comprimentos de onda entre 200 e 300 nm, e uma absorção menor entre 300 e 500 nm, conforme ilustrado na figura 4. A elevada absorção do leite na região UV-Vis do espectro deve-se principalmente ao teor de gordura e proteína. Vale ressaltar que este espectro foi idêntico nas três repetições realizadas para cada amostra.

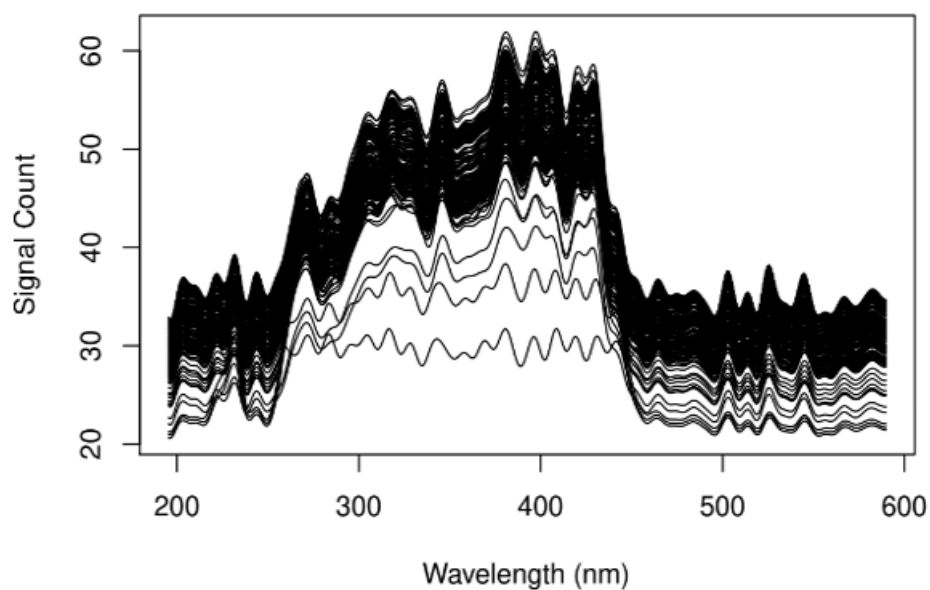


Figura 4- Espectro representativo de um conjunto de amostras de leite

Após realizar o reconhecimento de padrões dos componentes do espectro, fez-se a discriminação dos espectros relativamente à correlação entre os dados laboratoriais e aqueles previstos com o sistema POC para o teor butírico (TB) teor proteico (TP), CCS e conteúdo de ureia.

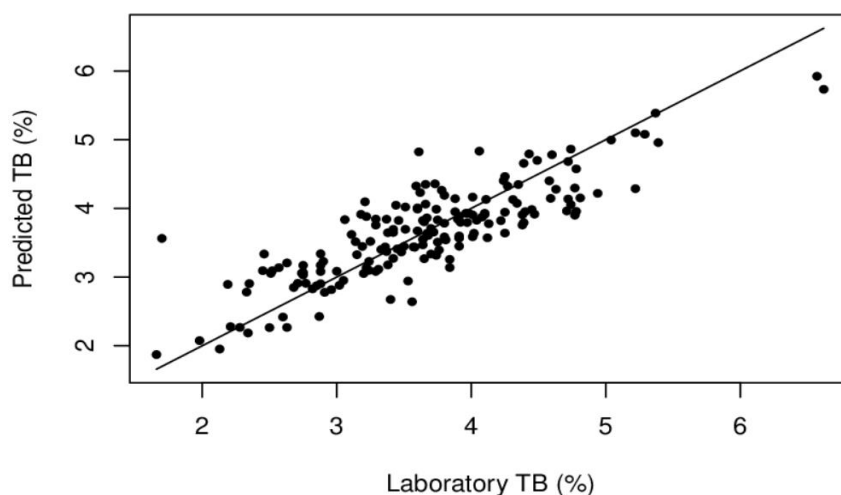


Figura 5 - Correlação entre a quantificação espectral (eixo y) de teor butírico (TB) e métodos convencionais (eixo x)

Para o teor butírico (Figura 5) foi registado um MAPE de 9,86%, indicando uma boa precisão entre os valores previstos e medidos, com um R de de 0,8453, o que evidencia uma correlação forte e positiva entre os dados observados e os estimados.

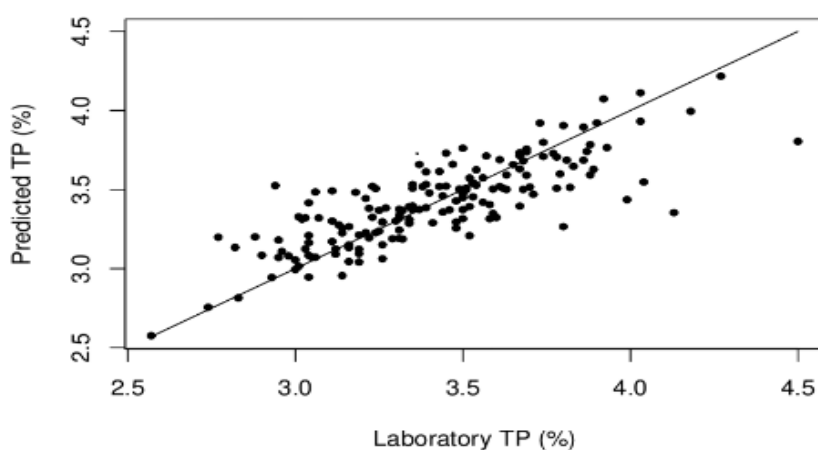


Figura 6 - Correlação entre a quantificação espectral (eixo y) de teor Proteico (TP) e métodos convencionais (eixo x)

Já para o TP (Figura 6) obtiveram-se resultados semelhantes com MAPE de 4,11%, ou seja, com baixa margem de erro entre os valores previstos e os medidos, e um R de 0,789 uma correlação positiva significativa entre os dados observados e os estimados.

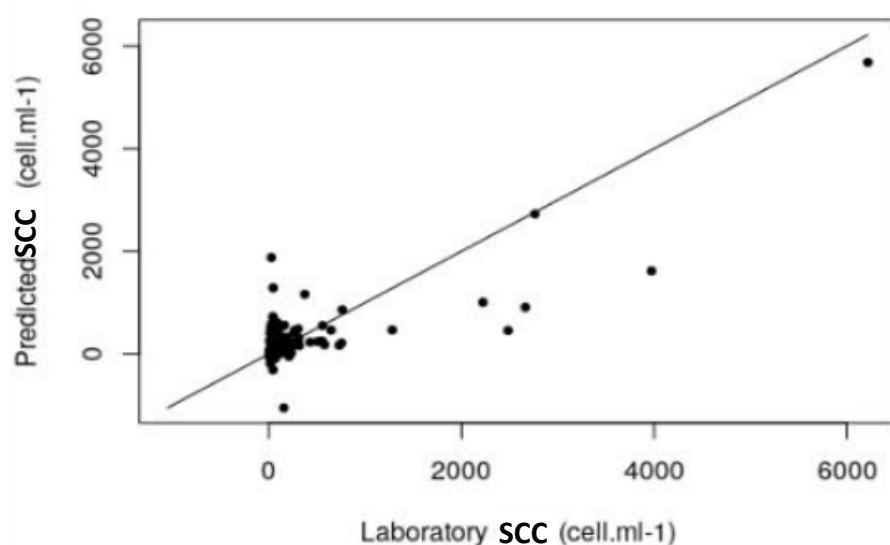


Figura 7 - Correlação entre a quantificação espectral da contagem de células somáticas (CCS) e métodos convencionais

Os resultados obtidos para a Contagem de Células Somáticas (CCS) (Figura 7) indicaram um MAPE de 34,73%, refletindo alguma discrepância entre os valores previstos e medidos. No entanto, o R foi de 0,808, demonstrando uma correlação relativamente forte entre os dados observados e os estimados. Neste sentido apesar do erro percentual elevado, há uma boa linearidade entre as previsões e os valores reais.

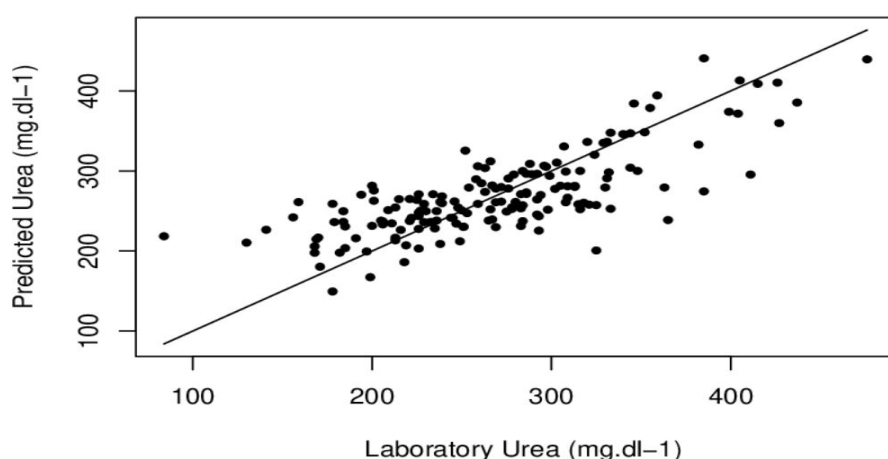


Figura 8 - Correlação entre a quantificação espectral de ureia (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

Os resultados obtidos para ureia (Figura 8) indicaram um MAPE de 13,53%, refletindo uma diferença moderada entre os valores previstos e os observados. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,766, sugerindo uma boa correlação entre os dados medidos e os estimados, mostrando assim um desempenho satisfatório.

4.2. Espectroscopia do sangue/ ADVIA® 2120

Como as colheitas de sangue foram realizadas em conjunto com os controles anuais de sanidade dos animais, foi analisado um número menor de amostras de sangue em comparação com as de leite, cujas colheitas ocorreram durante os contrastes leiteiros mensais. O espectro do sangue apresentou-se claramente distinto do espectro do leite, mantendo um padrão consistente nas repetições das amostras (Figura 9).

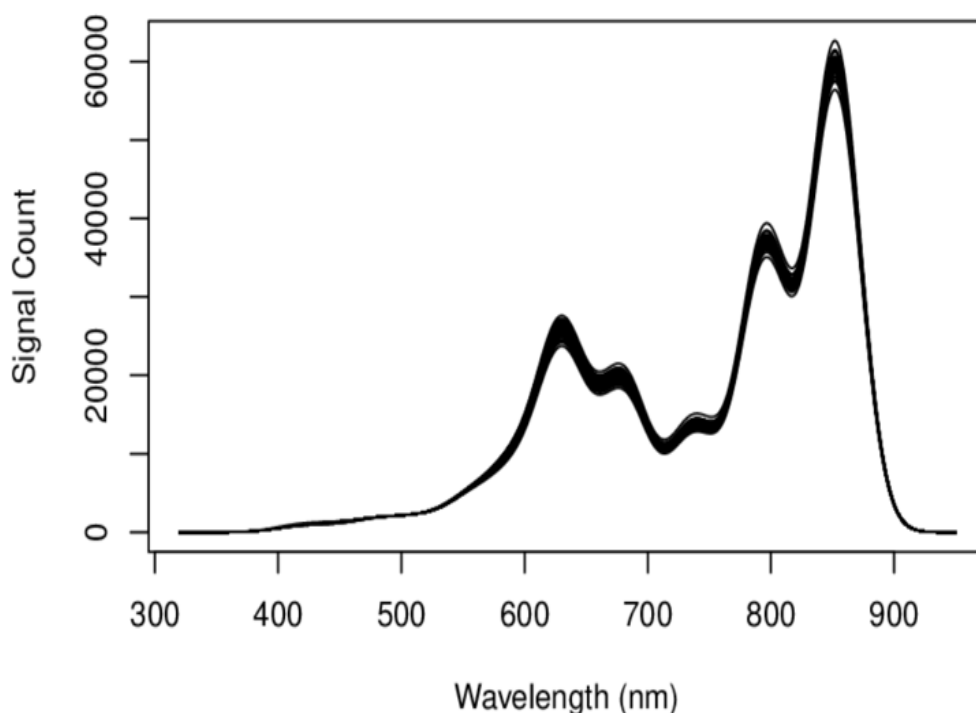


Figura 9- Espectro representativo de um conjunto de amostras de sangue

No âmbito do sangue, os eritrócitos são as células dominantes no espectro do sangue total e a Hgb domina a absorvância/transmitância na região Vis-NIR. Constituintes de menor absorvância ou menor concentração aparecem como interferências nas características espectrais dominantes, como é o caso da Bilirrubina que interfere com a Hgb numa faixa significativa de comprimento de onda. Com o POC, a hemoglobina (Figura 10) teve um baixo erro, MAPE de 3,14%, demonstrando uma excelente

precisão, com uma margem de erro bastante reduzida entre os valores previstos e medidos. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,832, sugerindo uma correlação forte e positiva entre os dados observados e estimados.

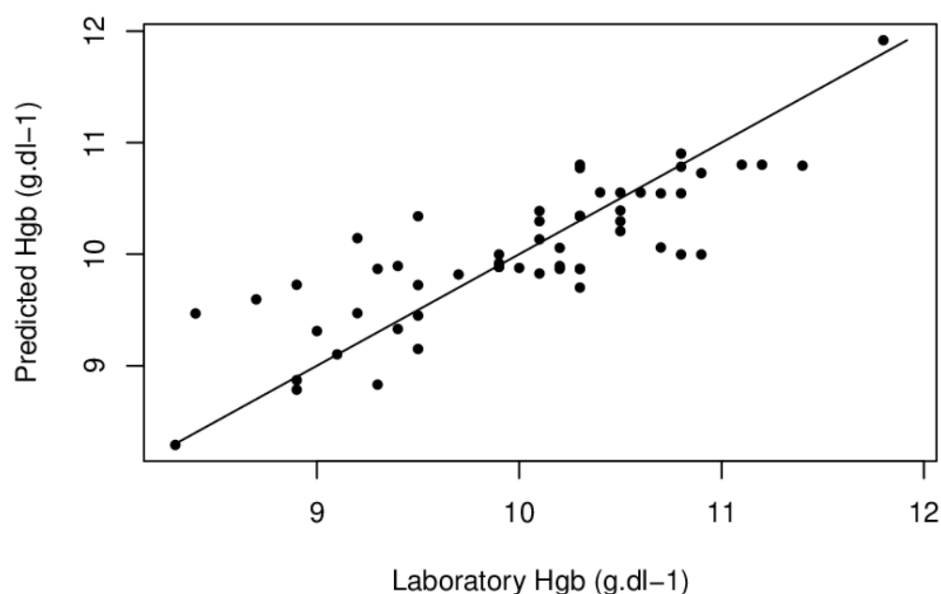


Figura 10 - Correlação entre a quantificação espectral de hemoglobina (Hgb) (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

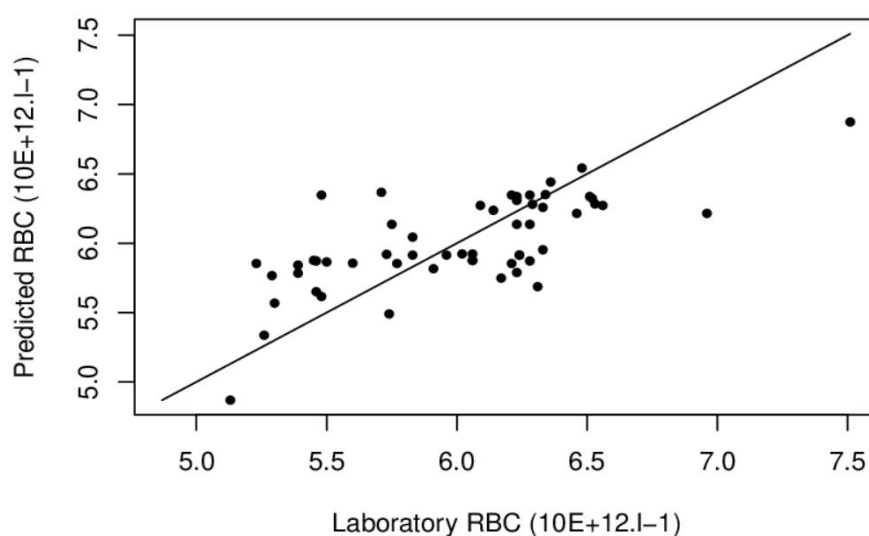


Figura 11 - Correlação entre a quantificação espectral de eritrócitos (RBC) (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

A contagem de RBC (Figura 11) seguiu a mesma tendência, com um baixo erro, MAPE de 4,526%, e um coeficiente de correlação (R) de 0,7016, apontando para uma correlação moderada entre os dados observados e estimados.

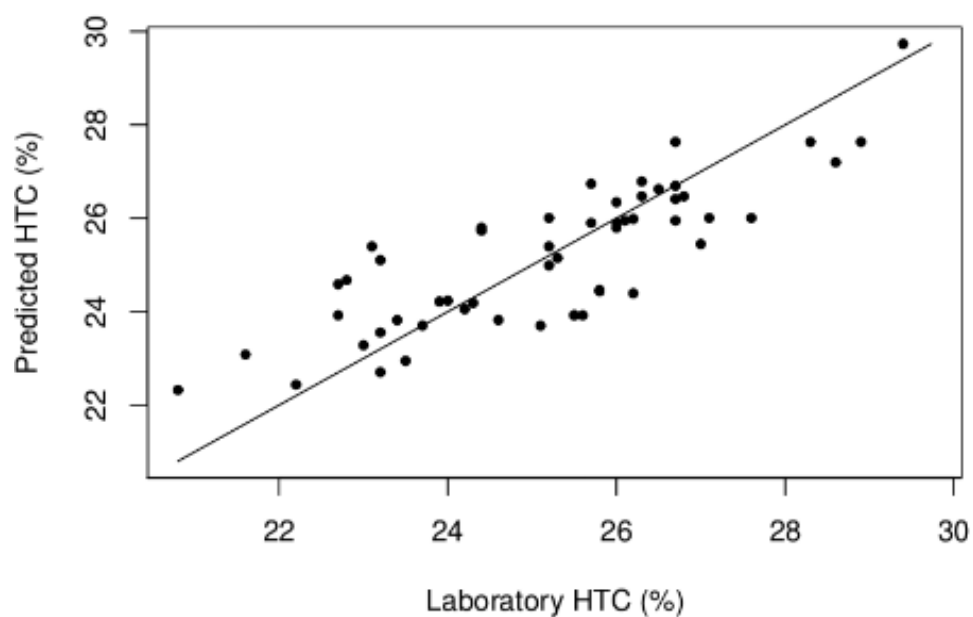


Figura 12 - Correlação entre a quantificação espectral de hematócrito (HTC) (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

Mais animadores foram os resultados relativos ao hematócrito (Figura 12), com um baixo erro, MAPE de 3,025%, indicando uma elevada precisão, e um R de 0,862, o que demonstra uma forte correlação positiva entre os dados observados e os estimados.

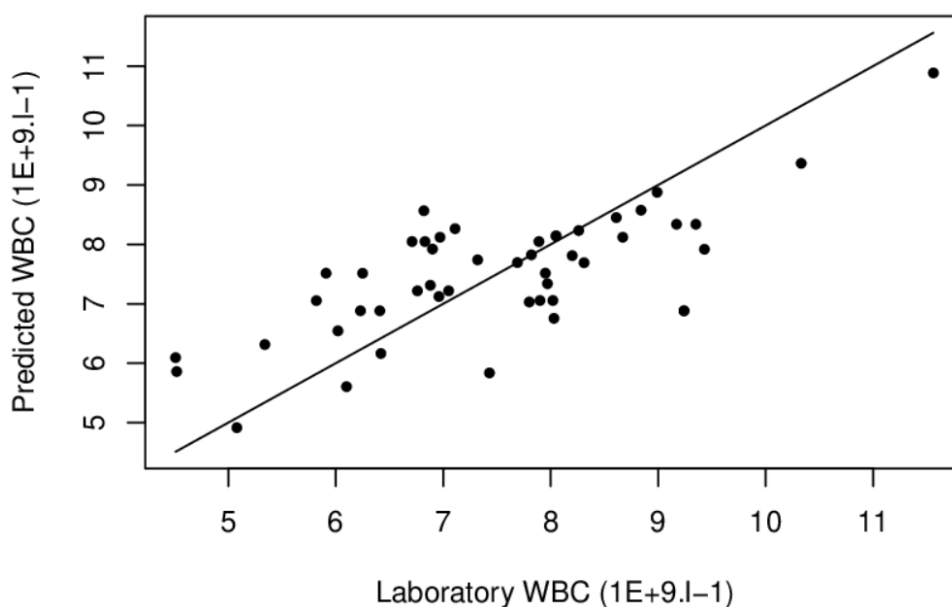


Figura 13 - Correlação entre a quantificação espectral de Leucócitos (WBC) (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

Apesar da menor quantidade de leucócitos em relação aos eritrócitos, com uma proporção aproximada de 1:1000, a informação espectral dos leucócitos é relevante devido ao seu impacto no espalhamento e na absorbância, representando entre 0,5% e 22,5% da informação espectral total. Na análise da contagem de leucócitos (WBC) (Figura 13), os resultados revelaram um MAPE de 11,08%, indicando um erro percentual aceitável entre os valores previstos e medidos. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,7194, sugerindo uma boa correlação.

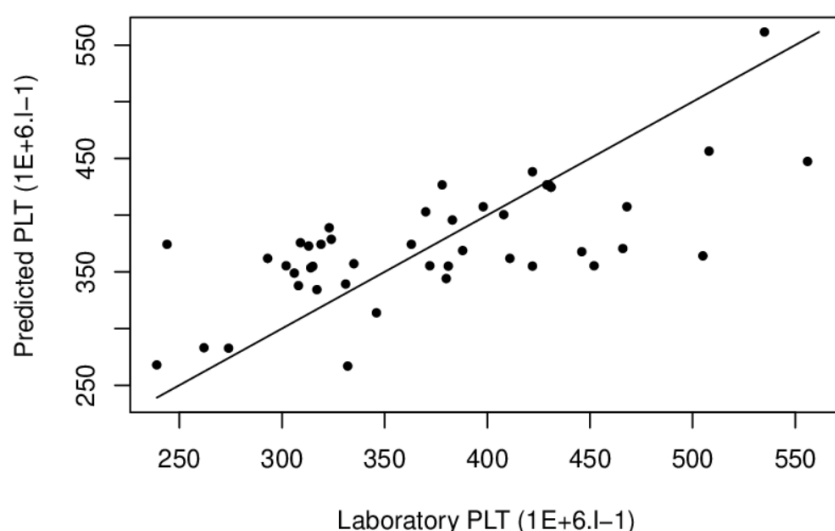


Figura 14 - Correlação entre a quantificação espectral das plaquetas (PLT) (eixo y) e métodos convencionais (eixo x)

Os resultados da análise das plaquetas (PLT) (Figura 14) indicaram um MAPE de 11,64%, refletindo uma margem de erro aceitável entre os valores previstos e observados. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,694, apontando para uma correlação positiva.

Estes resultados sugerem que, o método SLAI/COVM (Self Learning Artificial Intelligence) demonstra correlações altamente significativas para hemogramas de bovinos, nos parâmetros estudados. O COVM mantém a relação linear BLL para um grupo de amostras, demonstrando consistência na presença do mesmo tipo de interferência.

4.3. Relação entre parâmetros do leite e o hemograma

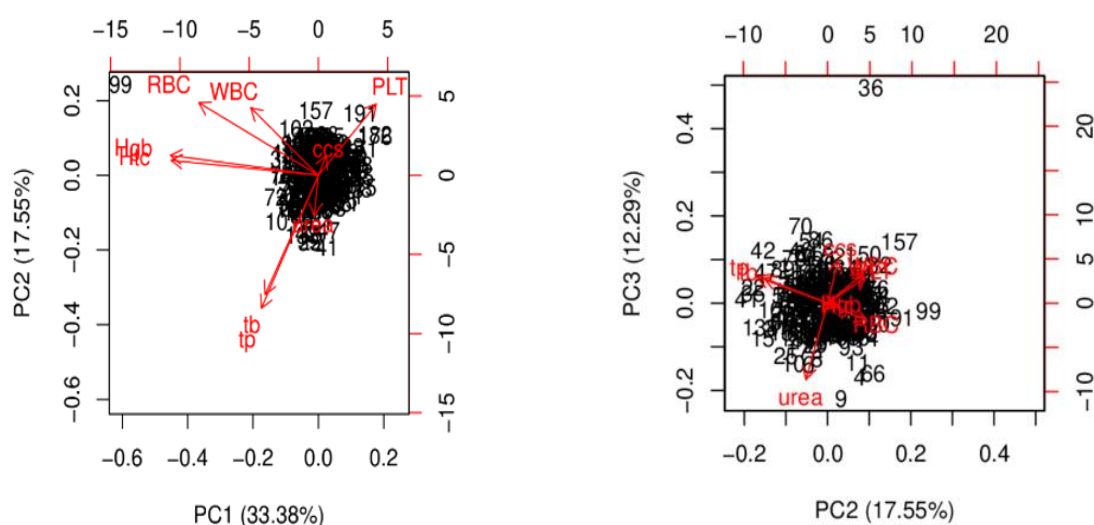
O algoritmo PCA (Análise de Componentes Principais) foi utilizado com o objetivo de explorar a relação entre os parâmetros do leite e os valores obtidos no hemograma. Este algoritmo é amplamente utilizado em análise multivariada, pois permite reduzir a dimensionalidade dos dados, mantendo ao máximo a variabilidade original, transformando o conjunto original de variáveis num novo conjunto, denominado componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais.

As componentes principais são calculadas de forma a capturar a maior variabilidade possível nos dados. A primeira componente principal (PC1) é aquela que explica a maior parcela da variabilidade total. Em seguida, a segunda componente principal (PC2) é calculada de forma a representar a segunda maior porção de variabilidade, com a condição de que seja ortogonal (independente) à primeira componente. Esse processo continua até que todas as componentes principais sejam extraídas, embora, na prática, apenas as primeiras sejam consideradas, pois elas tendem a explicar a maior parte da variabilidade dos dados.

Através do PCA, é possível interpretar quais variáveis originais têm maior contribuição para cada componente principal, permitindo, assim, identificar possíveis correlações ou padrões entre os parâmetros do leite e os valores do hemograma que não seriam facilmente observados com os dados brutos. Na Tabela 5, são apresentados os resultados obtidos e na figura 16 a representação vetorial da análise PCA.

Tabela 6:: Resultados da correlação de Person e Mape, obtidos por PCA, entre os parâmetros do hemograma e do leite

	R	MAPE
Teor butiroso	0.825	17.8%
Teor proteico	0.574	6.3%
CCS	0.595	451.5%
UREIA	0.665	15.84%



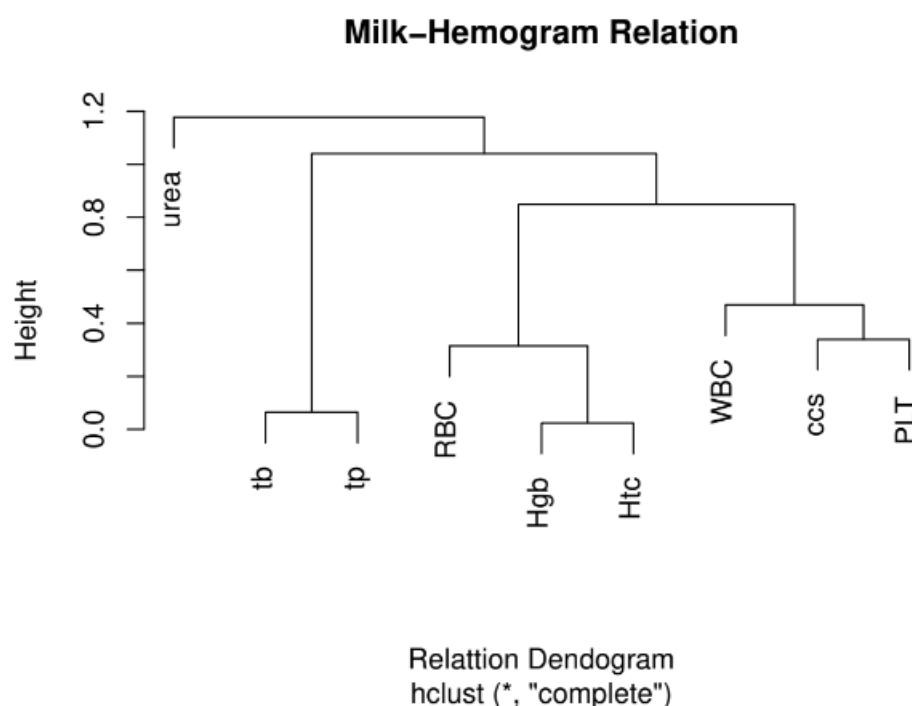


Figura 15 – Análise vetorial do PCA das componentes principal 1 (33.38%) e a componente principal 2 (17.55%) e PCA da componente principal 2 (17.55%) e componente principal 3 (12.29%) e relação entre as variáveis (Dendogram)

Os resultados demonstram que a informação fornecida pelo hemograma consegue explicar de forma significativa a composição do leite do mesmo animal. Em particular, o hemograma revela-se um teste altamente relevante para avaliar o bem-estar animal, assim como o seu estado geral de saúde e nutricional. Ficou comprovado que o teor de gordura do leite pode ser previsto pelo perfil do hemograma. Os teores de proteína e ureia estão qualitativamente relacionados com este perfil sanguíneo. Da mesma forma, é possível estimar a quantidade de células somáticas a partir do hemograma, uma vez que os níveis elevados ou baixos podem ser correlacionados com os resultados desta análise. No entanto, a quantificação de células somáticas no leite a partir do hemograma é uma análise classificativa, pois esta medição não contabiliza diretamente os leucócitos presentes no leite, mas sim todos os tipos de células; enquanto o hemograma é um indicador fiável da presença de infeção e/ou inflamação no animal. Em particular, valores excessivamente elevados de células somáticas podem não refletir corretamente o número de leucócitos no leite, o que pode afetar a correlação com os resultados do hemograma.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para o leite demonstram que o sistema POC é eficaz, não apenas pelo facto de o espectro produzido ser semelhante ao descrito em dispositivos de maiores dimensões (Tsenkova *et al.*, 2001), mas também pelas correlações significativas e pelas baixas taxas de erro em

comparação com os métodos convencionais, particularmente para o TB, o TP e a ureia. No entanto, para a CCS, embora tenha sido observada uma elevada correlação, o erro foi superior. Será fundamental avaliar conjuntos de amostras com e sem mastite, a fim de determinar a sensibilidade e especificidade alcançada na determinação deste parâmetro, mesmo considerando o erro associado a esta primeira avaliação. É também importante referir que um estudo recente utilizando Vis-NIR revelou diferenças significativas no teor de lactose entre amostras com e sem mastite (da Silva Pereira *et al.*, 2024). Este parâmetro não foi abordado no presente trabalho, mas seria relevante considerá-lo em estudos futuros. A maior taxa de erro associada à determinação da CCS não deve ser interpretada como um fator desencorajador desta metodologia por várias razões: 1) Este estudo teve como objetivo inicial avaliar a viabilidade do método; estudos subsequentes, com um maior número de amostras e a inclusão de mais parâmetros, serão fundamentais para melhorar a estimativa da CCS. Além disso, intervenções no processamento das amostras, como centrifugações prévias para remover os lípidos, poderão melhorar a estimativa deste parâmetro; 2) Esta metodologia não deve ser encarada como um diagnóstico laboratorial de "gold-standard", mas sim como uma ferramenta de análise rápida e económica de primeira linha. Mesmo com algum grau de erro, um método de baixo custo que sinalize amostras com valores elevados de CCS poderá ser eficaz ao permitir o encaminhamento dessas amostras para análise laboratorial mais aprofundada; 3) Embora possam existir diferenças nos valores, será crucial recolher mais dados para avaliar se as conclusões obtidas com o sistema POC são comparáveis às dos métodos convencionais. Em particular, será importante determinar se o número de amostras com mastite identificadas pelos dois métodos é semelhante. Por outras palavras, é essencial avaliar se a sensibilidade do sistema POC é comparável à da análise laboratorial e, sobretudo, verificar se ultrapassa a sensibilidade dos métodos atualmente disponíveis nas explorações leiteiras. Para isso, será necessário aumentar o número de amostras com mastite e associar a avaliação microbiológica, de forma a caracterizar melhor esta condição.

Relativamente aos parâmetros do hemograma, o aparelho POC apresentou um desempenho muito satisfatório, em linha com os resultados já obtidos para pequenos animais (Barroso *et al.*, 2021). Apesar de não existirem estudos com esta metodologia aplicados ao sangue bovino, o espectro desta espécie é comparável ao dos pequenos animais (Barroso *et al.*, 2022). Para o hematócrito e os leucócitos, observou-se uma boa correlação e um baixo erro na sua determinação.

Embora estes resultados sejam importantes, será necessário analisar um maior número de amostras para avaliar se o aparelho POC consegue discriminar corretamente os diferentes tipos de leucócitos. Este aspeto é relevante, uma vez que animais com mastite nem sempre apresentam leucocitose, mas sim uma alteração no perfil leucocitário, com um predomínio de linfócitos a ser substituído por neutrófilos (Alhussien *et al.*, 2015). Os resultados obtidos até agora indicam que, no âmbito da recolha de sangue para monitorização da sanidade animal, é possível obter dados hematológicos de

forma rápida e económica no campo. Estes dados poderão contribuir para uma monitorização mais eficaz do estado de saúde dos animais, o que poderá resultar numa maior eficiência produtiva.

A relação entre os parâmetros hematológicos e a produção de leite foi evidente na análise de PCA, que revelou uma correlação entre os parâmetros sanguíneos e o TB e o TP. No entanto, para a CCS, que é frequentemente utilizada como indicador da saúde da glândula mamária e da presença de infeções em bovinos, este estudo não forneceu evidências suficientes para estabelecer uma correlação direta com os parâmetros do hemograma. Esta falta de correlação poderá dever-se à variabilidade das amostras ou a uma limitação no número de amostras com valores elevados de CCS. Desta forma, serão necessários estudos adicionais com um maior número de amostras, especialmente em casos de mastite, para esclarecer a relação entre a CCS e os parâmetros do hemograma. Com uma amostragem mais robusta, será possível realizar uma análise mais detalhada e obter resultados mais consistentes, o que poderá proporcionar uma visão mais precisa das interações entre os parâmetros do leite e do hemograma, particularmente no que diz respeito à saúde da glândula mamária e à resposta imunológica dos animais. Adicionalmente, é importante lembrar que as proteínas de fase aguda são indicadores inflamatórios mais precisos do que as alterações nos leucócitos em bovinos. Embora estas proteínas não tenham sido incluídas no presente estudo, há a intenção de as considerar em investigações futuras.

Assim, em conclusão o novo método apresentado “MyVet”, demonstrou ser capaz de alcançar resultados consistentes em todos os parâmetros avaliados. Isso sugere que esta ferramenta POC pode ser uma adição valiosa à prática veterinária, especialmente no auxílio ao diagnóstico e combate à mastite em campo. A mastite, continua sendo um dos principais desafios na produção leiteira, e métodos mais eficientes e acessíveis para seu diagnóstico podem melhorar significativamente a saúde animal e a qualidade do leite.

A tecnologia “MyVet” no contexto de POC oferece uma abordagem prática e rápida para o médico veterinário, permitindo a avaliação de vários parâmetros diretamente no local, sem a necessidade de laboratórios externos. Isso pode resultar em diagnósticos mais rápidos e intervenções terapêuticas mais ágeis, o que é crucial para controlar e tratar a mastite de forma eficaz. São necessários mais estudos para explorar todo o potencial dessa tecnologia POC. Em particular, será necessário investigar mais profundamente a contagem diferencial de leucócitos, que pode fornecer informações mais detalhadas sobre a resposta imunológica do animal. Além disso, uma melhor compreensão da relação entre os leucócitos e a CCS será fundamental, já que ambas as medições são importantes indicadores da saúde da glândula mamária e da presença de infeções como a mastite.

Dessa forma, embora o “MyVet” já demonstre um grande potencial para o uso clínico veterinário, a realização de estudos adicionais permitirá aprimorar ainda mais sua aplicabilidade e precisão, trazendo benefícios ainda maiores à prática veterinária no manejo de doenças como a mastite. O prin-

cípio fundamental dos métodos analíticos reside na utilização de informações específicas de um constituinte, assegurando que dados exclusivos sejam empregues para sua identificação e quantificação. A espectroscopia Vis-NIR emprega modelos de Covariância (COVM) como uma estratégia para garantir que os constituintes sejam quantificados com base em informações específicas, minimizando interferências de outros componentes presentes no espectro. Dessa forma, ao utilizar COVM, o método consegue isolar informações espectrais exclusivas de cada constituinte, aprimorando a precisão e a confiabilidade das quantificações realizadas. Essa abordagem é essencial para assegurar que cada componente seja identificado e quantificado com base na sua assinatura espectral única, sem influência significativa de outros constituintes na amostra.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res*, 12(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- Adkins, P. R. F., & Middleton, J. R. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34(3), 479-491. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Hogeveen, H., Keefe, G. P., & Dufour, S. (2018). Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Front Vet Sci*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
- Aires, T. (2010). Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. In: Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Akers, R. M., & Nickerson, S. C. (2011). Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 275-289. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3>
- Akerstedt, M., Björck, L., Persson Waller, K., & Sternesjö, A. (2006). Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. *J Dairy Res*, 73(3), 299-305. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001774>
- Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, S. P., Mohanty, A. K., & Dang, A. K. (2015). A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. *Vet World*, 8(5), 685-689. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.685-689>
- Alhussien, M. N., & Dang, A. K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet World*, 11(5), 562-577. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Trop Anim Health Prod*, 50(6), 1193-1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- Barkema, H. W., von Keyserlingk, M. A. G., Kastelic, J. P., Lam, T. J. G. M., Luby, C., Roy, J. P., LeBlanc, S. J., Keefe, G. P., & Kelton, D. F. (2015). Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7426-7445. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9377>
- Barroso, T. G., Ribeiro, L., Gregório, H., Monteiro-Silva, F., Neves dos Santos, F., & Martins, R. C. (2022). Point-of-Care Using Vis-NIR Spectroscopy for White Blood Cell Count Analysis. *Chemosensors*, 10(11), 460. <https://www.mdpi.com/2227-9040/10/11/460>

- Barroso, T. G., Ribeiro, L., Gregório, H., Santos, F., & Martins, R. C. (2021). Point-of-care Vis-SWNIR spectroscopy towards reagent-less hemogram analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 343, 130138. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130138>
- Barroso, T. G., Ribeiro, L., Gregório, H., Santos, F., & Martins, R. C. (2021). Visible–Near-Infrared Platelets Count: Towards Thrombocytosis Point-of-Care Diagnosis. *Chemistry Proceedings*, 5(1), 78. <https://www.mdpi.com/2673-4583/5/1/78>
- Bausewein, M., Mansfeld, R., Doherr, M. G., Harms, J., & Sorge, U. S. (2022). Sensitivity and Specificity for the Detection of Clinical Mastitis by Automatic Milking Systems in Bavarian Dairy Herds. *Animals (Basel)*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/ani12162131>
- Bradford, B. J., Yuan, K., Farney, J. K., Mamedova, L. K., & Carpenter, A. J. (2015). Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci*, 98(10), 6631-6650. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9683>
- Bruckmaier, R. M., & Wellnitz, O. (2017). TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM/BOLFA: Pathogen-specific immune response and changes in the blood-milk barrier of the bovine mammary gland. *J Anim Sci*, 95(12), 5720-5728. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1845>
- Butler, J. E., Rainard, P., Lippolis, J., Salmon, H., & Kacskovics, I. (2015). Chapter 116 - The Mammary Gland in Mucosal and Regional Immunity. In J. Mestecky, W. Strober, M. W. Russell, B. L. Kelsall, H. Cheroutre, & B. N. Lambrecht (Eds.), *Mucosal Immunology (Fourth Edition)* (pp. 2269-2306). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00116-6>
- Carvalho-Sombra, T. C. F., Fernandes, D. D., Bezerra, B. M. O., & Nunes-Pinheiro, D. C. S. (2021). Systemic inflammatory biomarkers and somatic cell count in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet Anim Sci*, 11, 100165. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100165>
- Chanvallon, A., Coyral-Castel, S., Gatien, J., Lamy, J. M., Ribaud, D., Allain, C., Clément, P., & Salvetti, P. (2014). Comparison of three devices for the automated detection of estrus in dairy cows. *Theriogenology*, 82(5), 734-741. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.010>
- Chapinal, N., Weary, D. M., Collings, L., & von Keyserlingk, M. A. (2014). Lameness and hock injuries improve on farms participating in an assessment program. *Vet J*, 202(3), 646-648. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.018>
- Coppa, M., Revello-Chion, A., Giaccone, D., Ferlay, A., Tabacco, E., & Borreani, G. (2014). Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. *Food Chem*, 150, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.087>
- Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., Castro, G., Casaux, M. L., Fraga, M., Zunino, P., Bado, I., & Vignoli, R. (2020). Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in Escherichia coli Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay [Brief Research Report]. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.588919>
- Crookenden, M. A., Heiser, A., Murray, A., Dukkipati, V. S. R., Kay, J. K., Loo, J. J., Meier, S., Mitchell, M. D., Moyes, K. M., Walker, C. G., & Roche, J. R. (2016). Parturition in dairy cows temporarily alters the expression of genes in circulating neutrophils. *J Dairy Sci*, 99(8), 6470-6483. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10877>
- da Silva Pereira, E., Cruz-Tirado, J. P., Lourenço Crippa, B., Martins Morasi, R., Milagres de Almeida, J., Fernandes Barbin, D., Barbon Junior, S., & Cristina Cirone Silva, N. (2024). Portable near infrared (NIR) spectrometer coupled with machine learning to classify milk with subclinical mastitis. *Food Control*, 163, 110527. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110527>
- Dasohari, A., Somasani, A., Nagaraj, P., & Gopala, R. A. (2018). Comparative studies for efficacy of different diagnostic tests of sub-clinical mastitis in cows. *The Pharma Innovation Journal*(7), 149–152.
- de la Roza-Delgado, B., Garrido-Varo, A., Soldado, A., Arrojo, A. G., Valdés, M. C., Maroto, F., & Pérez-Marín, D. (2017). Matching portable NIRS instruments for *in situ* monitoring indicators of milk composition. *Food Control*, 76, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.004>

- Deshapriya, R. M. C., Rahularaj, R., & Ranasinghe, R. (2019). Mastitis, Somatic cell count and milk quality ; an overview. *Sri Lanka Veterinary Journal*, 66, 1-12. <https://doi.org/10.4038/slvj.v66i1.32>
- Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., & Seegers, H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res*, 33(4), 335-357. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002021>
- Egyedy, A. F., & Ametaj, B. N. (2022). Mastitis: Impact of Dry Period, Pathogens, and Immune Responses on Etiopathogenesis of Disease and its Association with Periparturient Diseases. *Dairy*, 3(4), 881-906. <https://www.mdpi.com/2624-862X/3/4/61>
- Eurostat. (2024). *Milk and dairy products*. Eurostat
- Evangelista, C., Basiricò, L., & Bernabucci, U. (2021). An Overview on the Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) on Farms for the Management of Dairy Cows. *Agriculture*, 11(4), 296. <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/4/296>
- Garcia-Cordero, J. L., Barrett, L. M., O'Kennedy, R., & Ricco, A. J. (2010). Microfluidic sedimentation cytometer for milk quality and bovine mastitis monitoring. *Biomed Microdevices*, 12(6), 1051-1059. <https://doi.org/10.1007/s10544-010-9459-5>
- Grenvall, C., Folkenberg, J. R., Augustsson, P., & Laurell, T. (2012). Label-free somatic cell cytometry in raw milk using acoustophoresis. *Cytometry A*, 81(12), 1076-1083. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22214>
- Hogeveen, H., Klaas, I. C., Dalen, G., Honig, H., Zecconi, A., Kelton, D. F., & Sánchez Mainar, M. (2021). Novel ways to use sensor data to improve mastitis management. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 11317-11332. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19097>
- IFAP. (2024). *Animais Residentes na Base Dados SNIRA a 31.12.2023 e Entregas mensais de leite cru de vaca – ano 2023*. Instituto de financiamento da agricultura e pescas
- Kalinin, A., Krashennikov, V., Sadovskiy, S., & Yurova, E. (2013). Determining the composition of proteins in milk using a portable near infrared spectrometer. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 21(5), 409-415. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1054>
- Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., & Natsuga, M. (2008). Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(1), 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.01.006>
- Kim, B., Lee, Y. J., Park, J. G., Yoo, D., Hahn, Y. K., & Choi, S. (2017). A portable somatic cell counter based on a multi-functional counting chamber and a miniaturized fluorescence microscope. *Talanta*, 170, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.014>
- Koeck, A., Loker, S., Miglior, F., Kelton, D. F., Jamrozik, J., & Schenkel, F. S. (2014). Genetic relationships of clinical mastitis, cystic ovaries, and lameness with milk yield and somatic cell score in first-lactation Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5806-5813. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2013-7785>
- Laporte, M. F., & Paquin, P. (1999). Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk. *J Agric Food Chem*, 47(7), 2600-2605. <https://doi.org/10.1021/jf980929r>
- Martins, R. C., Barroso, T. G., Jorge, P., Cunha, M., & Santos, F. (2022). Unscrambling spectral interference and matrix effects in Vitis vinifera Vis-NIR spectroscopy: Towards analytical grade 'in vivo' sugars and acids quantification. *Computers and Electronics in Agriculture*, 194, 106710. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.106710>
- Martins, S. A. M., Martins, V. C., Cardoso, F. A., Germano, J., Rodrigues, M., Duarte, C., Bexiga, R., Cardoso, S., & Freitas, P. P. (2019). Biosensors for On-Farm Diagnosis of Mastitis [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00186>
- Oltenacu, P., & Broom, D. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, 19. <https://doi.org/10.1017/S0962728600002220>
- Oravcova, M., Čobirka, M., Mačuhová, L., Uhrincat, M., & Tancin, V. (2024). Relationships Between and Variation of Cows' Somatic Cell Score and Milk Traits. 27, 1-7. <https://doi.org/10.15414/afz.2024.27.01.1-7>
- Paibomesai, M. A., Sharif, S., Karrow, N., & Mallard, B. A. (2018). Type I and type II cytokine production of CD4+ T-cells in immune response biased dairy cattle around calving. *Veterinary Immunology*

- and *Immunopathology*, 199, 70-76.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.03.001>
- Pemberton, R. M., Hart, J. P., & Mottram, T. T. (2001). An assay for the enzyme N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAGase) based on electrochemical detection using screen-printed carbon electrodes (SPCEs). *Analyst*, 126(11), 1866-1871. <https://doi.org/10.1039/b104874k>
- Ribeiro Júnior, J. C., Oliveira, A. M. d., Silva, F. G., Garcia, L. N. H., Lobo, C. M. d. O., Alexandrino, B., Tamanini, R., & Beloti, V. (2019). Influência da qualidade microbiológica do leite cru na vida útil do leite pasteurizado. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(4), 1469-1476. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1469>
- Rocha, F. S., Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Kaliaguine, S., & Patience, G. S. (2018). Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy-UV-Vis. *The Canadian journal of chemical engineering*.
- Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australas J Anim Sci*, 24(3), 429-438. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q*, 41(1), 107-136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Silva, V. M., Souza, M. T., Blagitz, M. G., Souza, F. N., Batista, C. F., Alves, A. J., Fernandes, A. C. C., Sanchez, E. M. R., Ordinola-Ramirez, C. M., da Costa, L., & Della Libera, A. M. M. P. (2021). Milk lymphocyte profile and macrophage functions: new insights into the immunity of the mammary gland in quarters infected with *Corynebacterium bovis*. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 282. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02989-5>
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *J Dairy Sci*, 85(3), 487-493. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74099-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74099-X)
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning. <https://books.google.pt/books?id=D13EDQAAQBAJ>
- Sordillo, L. M. (2018). Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34(3), 507-523. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.005>
- Suárez, P. L., Soldado, A., González-Arrojo, A., Vicente, F., & de la Roza-Delgado, B. (2018). Rapid on-site monitoring of fatty acid profile in raw milk using a handheld near infrared sensor. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.03.003>
- Sumon, S. M. M. R., Parvin, M. S., Ehsan, M. A., & Islam, M. T. (2020). Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Vet World*, 13(8), 1709-1713. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1709-1713>
- Tan, X., Ding, S. Q., Hu, Y. X., Li, J. J., & Zhou, J. Y. (2012). Development of an immunosensor assay for detection of haptoglobin in mastitic milk. *Vet Clin Pathol*, 41(4), 575-581. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00468.x>
- Tsenkova, R. (2009). Aquaphotomics: Dynamic Spectroscopy of Aqueous and Biological Systems Describes Peculiarities of Water. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17(6), 303-313. <https://doi.org/10.1255/jnirs.869>
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Kawano, S., & Toyoda, K. (2001). Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. *J Anim Sci*, 79(10), 2550-2557. <https://doi.org/10.2527/2001.79102550x>
- Welbeck, K., Leonard, P., Gilmartin, N., Byrne, B., Viguier, C., Arora, S., & O'Kennedy, R. (2011). Generation of an anti-NAGase single chain antibody and its application in a biosensor-based assay for the detection of NAGase in milk. *J Immunol Methods*, 364(1-2), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.09.019>
- Yakubu, H. G., Kovacs, Z., Toth, T., & Bazar, G. (2022). The recent advances of near-infrared spectroscopy in dairy production-a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(3), 810-831. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829540>

Zeng, J., Guo, Y., Han, Y., Li, Z., Yang, Z., Chai, Q., Wang, W., Zhang, Y., & Fu, C. (2021). A Review of the Discriminant Analysis Methods for Food Quality Based on Near-Infrared Spectroscopy and Pattern Recognition. *Molecules*, 26(3), 749. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/3/749>

Avaliação de método alternativo para análise de leite e sangue no diagnóstico de mastite bovina – Point-of-care sem reagentes

Alexandra Isabela Conceição Costa

ICBAS

