

Uma nova estratégia imunológica para o diagnóstico de mastite bovina subclínica

Shigehiro Funayama

Doutor e Titular em Ciências Bioquímicas
Professor Bioquímica e Biofísica da Universidade Tuiuti do Paraná

Cristiane Gugelmin

Química Industrial pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Dicezar Gonçalves

Médico Veterinário
Especialista em Genética e Melhoramento Animal

Antônio Carlos do Nascimento

Médico Veterinário
Especialista em Semiologia
Professor de Introdução a Medicina Veterinária e Semiologia da Universidade Tuiuti do Paraná

Cristiano José da Silva

Médico Veterinário

Ana Paula Borsari

Médica Veterinária

Resumo

A mastite bovina persiste como enfermidade causadora de enormes prejuízos a indústria leiteira, a despeito das intensivas pesquisas e medidas preventivas desenvolvidas em nível dos rebanhos durante as últimas décadas. Os antibióticos são amplamente usados para o combate de mastite, entretanto, este enfoque deve ser mudado para propiciar tratamentos mais econômicos e medidas preventivas mais eficientes. A fim de detectar mastite em nível subclínico que permita uma terapia precoce, um anti-soro contra BSA (Soro Albumina Bovina) foi preparado em ovino e a fração de imuno-g globulinas foi parcialmente purificada e utilizada em testes de imunodifusão radial como descritos por Mancini et al, (1965) com algumas modificações. As placas e câmaras foram preparadas com uma camada de gel de 2 mm de Agar bacteriológico nº 1 (Oxoid) a 1% em tampão fosfato 0,025 M pH 7,0 contendo 0,01% de azida sódica e 6 mg% da imuno-g globulina anti-BSA parcialmente purificada. Foram feitos orifícios de 5 mm de diâmetro no gel e cada um recebeu 40 mL da amostra de leite e após 48 horas os diâmetros das zonas de precipitina foram medidos. A concentração de BSA nas amostras foi extrapolada de uma curva padrão de BSA pura.

Palavras-chave: mastite bovina, imuno-g globulinas antialbumina bovina, imunodifusão radial, câmara de imunodifusão.

Abstract

Bovine mastitis remains as the infirmity causing the biggest economic losses to the dairy industry, despite the intensive research and prevention measures at herd level carried out for decades. Antibiotics are widely used to combat mastitis, but focus should be shifted from treatment to more economical and efficient prevention. In order to detect mastitis in sub clinical level which permit an early therapy, an antiserum against BSA (Bovine Serum Albumin) was raised in ovine and the immunoglobulin fraction was partially purified and used in the radial immunodiffusion test as described by Mancini et al., (1965) with some modifications. Plates and chambers were prepared with 2 mm thick gel layer using 1% (w/v) bacteriological agar nº 1 (Oxoid) in phosphate buffer 0.025 M pH 7.0 containing 0.01% sodium azide and 6 mg% of partially purified imuno-g globulin anti-BSA. Wells of 5 mm diameter were cut and 40 mL of each milk sample were transferred into them and the diameters of precipitin zones measured after 48 hours. The BSA concentration was extrapolated from a standard curve from pure BSA solution.

Key-words: bovine mastitis, imuno-g globulin anti bovine albumin, radial immunodiffusion, immunodiffusion chamber.

Sob o ponto de vista econômico, a mastite subclínica é uma forma de mastite muito importante porque ao causar grande diminuição na produção de leite (Kirk, 1984), acarreta grandes prejuízos aos produtores e maior custo do leite e seus derivados aos consumidores. A mastite é considerada subclínica quando há evidência de inflamação, sem no entanto apresentar anormalidades no leite (manchas de sangue, aquosidade, coágulos, flocos, etc.) ou no úbere (fibrose, edema inflamatório agudo e calor, dor e alteração acentuada da secreção, etc.). A identificação dos animais, e de seus tetos com mastite, é de grande importância para o controle da qualidade do leite e para finanças do produtor. O diagnóstico direto da mastite é feito com o isolamento e identificação de bactérias presentes no leite, e o indireto com a determinação de alterações na composição do leite, como por exemplo o aparecimento da catalase (Spencer & Simon, 1960), soroalbumina bovina (BSA) (Mancini *et al.*, 1965), imunoglobulinas (Giesecke & Viljoen, 1974), aumento do número de leucócitos (Kitchen & Middleton, 1976), N-acetyl-b-D-glucosaminidase (Kitchen, *et al.*, 1980), peptídeo inibidor da tripsina (Kitchen, 1981), etc. A presença destes indicadores varia com as diferentes frações do leite, por exemplo, a concentração de células somáticas totais (CCST) pode variar consideravelmente entre as frações de leite

coletadas em uma única ordenha (Sandholm *et al.*, 1984; Östensson *et al.*, 1988), isto é, nas frações de leite primordial e leite residual. Será denominado de leite primordial, o leite coletado manualmente ou mecanicamente após o descarte dos primeiros 5 a 10 mL de leite por ordenha manual. O leite residual representa o volume de leite retido pela glândula mamária após a ordenha exaustiva, mecânica ou manual. Esse leite é obtido por ordenha manual, dois minutos após a injeção de 10 UI de ocitocina na veia jugular do animal. Os dados da literatura especializada mostram que os indicadores de mastite até então estudados são importantes e estão correlacionados entre si, de maneira que essas correlações podem ser estreitas como aquelas entre Nagase e CCST (Kitchen & Middleton, 1976), proteases e CCST (Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981), PIT e BSA (Sandholm *et al.*, 1984) ou pobres como a da Nagase e PIT (Mattila & Sandholm, 1985).

Como hipótese de trabalho pareceu-nos oportuno reconsiderar as técnicas laboratoriais de diagnósticos de mastites, uma vez que, os testes utilizados com mais frequência atualmente, o “California Mastitis Test” (CMT) e a contagem de células somáticas (CCST), apesar de suas exequibilidades, são pouco precisos para o diagnóstico precoce de mastite subclínica. Além disso, os demais métodos utilizados para avaliação desse tipo

de mastite variam em complexidade, tempo operacional e sensibilidade. No Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná foram realizados experimentos que evidenciaram a existência de boas correlações entre níveis de CMT, CCST e BSA, que indicam a presença de processos inflamatórios. A BSA está presente na secreção láctea em quantidades iguais ou inferiores a 0,2 mg/mL (Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981; Kirk, 1984). Quando esses limites são ultrapassados indicam que processos inflamatórios e ou infecciosos aumentaram a permeabilidade capilar ou provocaram alguma lesão nas glândulas mamárias causando vazamento de proteínas plasmáticas, dentre elas a albumina. A metodologia básica utilizada no presente trabalho é à proposta por Mancini et al., (1965) com algumas modificações que se fizeram necessárias.

Materiais e métodos

Esquema de imunização e purificação parcial das imunoglobulinas antialbumina bovina

Os anticorpos foram preparados de acordo com a técnica proposta por Funayama et al., (1980), com algumas modificações. Foi utilizada uma ovelha fêmea

de 3 meses de idade e com 28 quilogramas. O soro controle foi obtido após a coagulação de 5 mL de sangue coletado antes da injeção de antígeno. Foram feitas quatro injeções de emulsões preparadas com a mistura de soro albumina bovina pura (BSA) e adjuvante de Freund na região dorsal do animal em intervalos de sete dias. Nas três primeiras injeções, as misturas emulsificadas de 1 mL, continham 1 mg de BSA e 0,5 mL do adjuvante completo de Freund. A quarta injeção foi intramuscular e a emulsão constituída de 1 mg de BSA e 0,5 mL do adjuvante incompleto de Freund. As coletas de sangue foram feitas por punções na jugular do animal e os imunosoros obtidos foram empregados diretamente nas imunodifusões sem nenhum tratamento prévio. O título de anticorpos no soro foi determinado semanalmente após a segunda injeção, pela técnica de dupla difusão (Ouchterlony & Nilsson, 1978). Após 30 dias da primeira injeção, foram coletadas sete amostras de sangue por canulação da jugular. O sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos e em seguida a 4 °C por 12 horas. O soro, 369 mL, foi separado e submetido a fracionamento com sulfato de amônio. As proteínas precipitadas entre 0 a 42% de saturação foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, redissolvidas em 80 mL de água destilada e dialisadas contra 4 L de água destilada a 4°C por 48 horas. As proteínas precipitadas durante a diálise

foram eliminadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos. O pH do sobrenadante foi corrigido dialisando-o contra tampão fosfato 20 mM pH 6,8 e submetido à adsorção em DEAE-celulose equilibrada com mesmo tipo de tampão. A solução de imuno-g-globulina (IgG), 123 mL, foi estocada a -20°C em alíquotas de 1,4 mL. A titulação imunológica da IgG parcialmente purificada foi realizada pela técnica de dupla difusão (Ouchterlony & Nilsson, 1978).

A monitoração do esquema de imunização e purificação parcial das imuno-g globulinas antialbumina bovina, foram realizados em câmaras de plástico rígido ou de acrílico com dimensões 6 x 6 x 1 cm, com tampas. Dentro de cada câmara foi construída uma cuba de 5 x 5 cm com bordas de 0,2 cm de altura, a qual foi preenchida com 5 mL da mistura de agar bacteriológico n.º 1 (Oxoid) a 1,0% e azida sódica 0,01%, dissolvidos em tampão fosfato 0,025 M, pH 7,0 a 45°C . Após a solidificação, foram feitos orifícios no gel, com auxílio de um tubo metálico com 5 mm de diâmetro interno e bordas cortantes. As posições dos orifícios foram estrategicamente programadas de modo que a distância linear entre os orifícios fosse de 2 cm e a distância diagonal entre eles de 3 cm, como mostrados nas figuras de imunodifusão. O volume máximo desses orifícios é de 40 + 1 mL, de modo que, soluções padrões de albumina ou as

amostras de leite podem ser aplicadas com uma pipeta Pasteur, não havendo necessidade do uso de micropipetas convencionais ou automáticas. A umidade de cada câmara foi garantida com o revestimento das bordas internas com um tecido umedecido com água. As câmaras foram fechadas com tampas e incubadas a 28°C por 48 horas, tempo suficiente para imunodifusão se processar. Os géis foram lavados com 2 litros de solução fisiológica (NaCl 0,95%) sob agitação constante por 48 horas para eluir o excesso de proteínas. As bandas de precipitinas foram coradas com Coomassie brilliant blue G, secadas em estufa a 60°C por 24 horas e documentadas fotograficamente.

Escala padrão de Imunodifusão

A escala padrão de imunodifusão foi realizada nos mesmos tipos de câmaras, com a diferença de que a mistura tamponada (tampão fosfato 0,025 M, pH 7,0) de agar bacteriológico e azida sódica foi adicionada de 6 mg% de proteínas da fração parcialmente purificada de IgG. Após a solidificação, foram feitos quatro orifícios no imunogel, dispostos como descrito anteriormente. Foram utilizadas seis câmaras de imunodifusão e para os quatro orifícios de cada placa foram transferidos volumes adequados da solução de BSA contendo uma quantidade fixa (5 mg a 30 mg) do

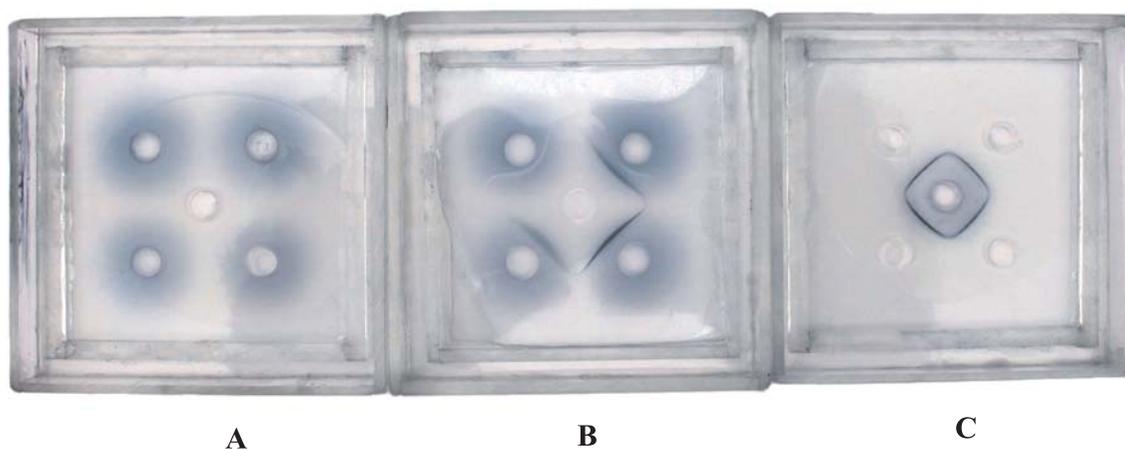


FIGURA 1: Imunização e Purificação da Fração de Imuno γ -globulinas Anti BSA

A câmara **A** mostra a imunodifusão do soro controle, isto é, do soro do animal antes de iniciar o processo de imunização. A câmara **B** mostra em sentido anti-horário a produção de anticorpos pelo animal durante a imunização. A câmara **C** mostra a pureza e homogeneidade da fração de IgG purificada. No orifício central do gel da câmara **A** foi aplicado 10 mL do soro controle, da câmara **B** 10 mL do imunosoro e da câmara **C** 10 mL da solução de IgG parcialmente purificada. Iniciando do orifício superior esquerdo de cada gel e em sentido anti-horário, foram aplicadas, quantidades de 5; 10; 15 e 30 mg de BSA em solução.

antígeno. Sempre que necessário, os volumes dos orifícios foram completados com tampão fosfato 0,025 M, pH 7,0. As câmaras assim preparadas foram incubadas a temperatura de 28° C a 30° C por 48 horas. No final desse período as câmaras com imunogel foram lavadas com 2 litros de solução fisiológica (NaCl 0,95%) sob agitação constante por 48 horas para eluir o excesso de proteínas. Os halos de precipitinas dos géis foram corados com Coomassie brilliant blue G, secados em estufa a 60°C por 24 horas e seus diâmetros determinados e utilizados como escala padrão de imunodifusão.

Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas com o método proposto por Bradford (1976).

Amostragem de leite

As amostras de leite foram coletadas obedecendo a certos critérios de higiene e assepsia, isto é, os tetos foram lavados com jatos de água clorada a 3% [30 mL de água sanitária diluída em 1000 mL de água potável],

TABELA I - Escala Padrão de Imunodifusão.

A escala padrão foi feita utilizando seis câmaras de imunodifusão e os géis com quatro orifícios de cada câmara foram preenchidos com quantidades fixas de BSA que variaram de 5 a 30 mg.

BSA (μg)	mg de BSA (mL de leite)	Diâmetro Médio dos Halos (mm \pm 2)
5	0,125	8
10	0,250	10
15	0,375	12
20	0,500	15
25	0,625	17
30	0,750	18

contida em frascos “Pisseti”, enxaguados com jatos de água potável morna recentemente fervida e enxaguados com papel toalha descartável, tomando o cuidado de não utilizar o mesmo papel para enxugar diferentes tetos. A ponta de cada teto foi limpa com cotonete embebido com álcool a 70%, expondo o esfíncter externo por pressão, para garantir a remoção de sujidades e ceras do orifício. O ordenhador foi orientado para lavar as mãos com água potável e sabão e, enxugá-las com papel toalha descartável. Quando a ordenha era mecanizada, os tubos de sucção foram conservados em solução alcoólica de iodo a 5% [5 g de iodo metálico e 2 g de iodeto de potássio dissolvidos em 100 ml de álcool a 70%]. Antes de aplicar os tubos de sucção, os mesmos foram enxaguados com água potável morna, recentemente fervida. Para coleta de amostras de pequeno volume,

[20 a 30 mL de leite de cada teto] foram usados frascos estéreis adequadamente identificados [Teto anterior direito = **TAD**; Teto anterior esquerdo = **TAE**; Teto posterior direito = **TPD**; Teto posterior esquerdo = **TPE**] incluindo o nome do animal, data e hora da ordenha e nome do ordenhador. Em casos de demora entre a coleta e o exame laboratorial, as amostras de leite foram imediatamente esfriadas [banho de gelo] acondicionadas em frascos bem fechados e transportadas sob refrigeração.

Análises imunológicas de leite

Um total de 96 amostras de leite foi analisado pela imunodifusão radial. Nestas análises, amostras de 40 mL leite de cada teto de um mesmo animal foram aplicadas separadamente em orifícios correspondentes do

imunogel. As câmaras foram incubadas a temperatura de 28° C a 30° C por 48 horas. Os halos de precipitinas que se formaram eram bem visíveis, de maneira que seus diâmetros foram medidos diretamente, sem a necessidade de corá-los, e comparados com os da escala padrão.

Resultados e discussão

A mastite subclínica é uma forma de mastite que causa grande diminuição na produção de leite acarretando grandes prejuízos aos produtores e elevando o

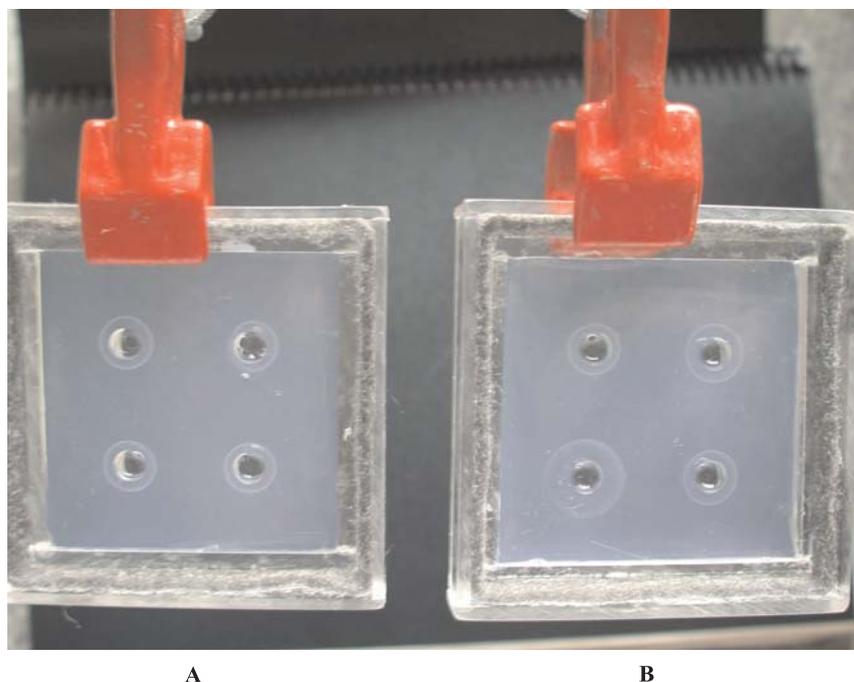


FIGURA 2: Análises Imunológicas do Leite

O imunogel da câmara **A** mostra halos de precipitina formados após a aplicação da amostra de leite coletado de tetos saudios. O imunogel da câmara **B** mostra na parte superior esquerda o halo de imunoprecipitina formado após a aplicação da amostra de leite coletado de um teto sadio (TAE). Em sentido horário se observa dois outros halos de leites coletados de tetos também considerados saudios (TAD e TPD) e o último halo corresponde (TPE) ao leite coletado do teto com mastite subclínica.

custo do leite e seus derivados aos consumidores. A mastite é considerada subclínica quando o animal apresenta evidências de inflamação no úbere, sem no entanto apresentar anormalidades no leite. Entretanto, essas evidências nem sempre são possíveis de serem observadas ou constatadas em tempo hábil. O diagnóstico direto da mastite com o isolamento e identificação de bactérias presentes no leite, e o indireto com a determinação de alterações na composição do leite, como por exemplo o aparecimento da catalase (Spencer & Simon, 1960), soroalbumina bovina (BSA) (Mancini *et al.*, 1965), imunoglobulinas (Giesecke & Viljoen, 1974), aumento do número de leucócitos (Kitchen & Middleton, 1976), N-acetyl-b-D-glucosaminidase (Kitchen, *et al.*, 1980), peptídeo inibidor da tripsina (Kitchen, 1981), etc. A presença destes indicadores varia com as diferentes frações do leite, como é o caso da concentração de células somáticas que varia consideravelmente entre as frações de leite coletadas em uma única ordenha (Sandholm *et al.*, 1984; Östensson *et al.*, 1988). Devido às dificuldades técnicas operacionais e dos inúmeros fatores que interferem no diagnóstico seguro de mastites subclínicas, pareceu-nos oportuno reconsiderar o problema e tentar minimizá-lo pelo menos em parte. As técnicas propostas neste trabalho são de fáceis

execuções e sua reprodutibilidade é aproximadamente de 95%. A câmara de imuno agar gel certamente contribuirá para obtenção de diagnósticos seguros de mastite subclínica, com as vantagens de poderem ser obtidos no campo sem necessitar de equipamentos sofisticados.

A análise das bandas de precipitinas do gel de titulação e de purificação dos anticorpos (Figura 1) mostra a homogeneidade do antígeno utilizado para o preparo das IgG anti-BSA, uma vez que em todos eles se observam bandas de precipitinas únicas e bem definidas. Os halos de precipitinas da escala padrão (figura não mostrada) são nítidos e bem definidos. Entretanto, algumas das amostras de leite além dos halos de precipitinas bem definidos mostraram a formação de um outro mais periférico e difuso, sugerindo que proteases liberadas pelas rupturas de células somáticas (Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981) ou dos agentes infecciosos, hidrolisam parcialmente a BSA presente no leite produzindo fragmentos peptídicos com maior coeficiente de difusão e com capacidade de formar complexos com a IgG anti-BSA. A precisão desta tecnologia de diagnóstico é altamente sensível, tendo-se em mente que no limite mínimo da escala foi utilizando cinco microgramos (5 mg) de BSA e considerando ainda que a difusão é radial.

TABELA II - Correlações entre Contagem de Células Somáticas (CCS), Califórnia Mastitis Test (CMT) e Imunodifusão Radial

No.de Animais	CCS x10 ³ Células/mL	CMT	Comentário Segundo Philpot & Nickerson	Albumina no Leite (mg/mL)	Diâmetro do halo definido (mm)	Diâmetro do halo difuso (mm)	Comentários deste trabalho
35	100 a 350	0 a traços	Normal	0,20 a 0,30	10 a 12	0	Normal
28	100 a 350	0 a traços	Normal	0,20 a 0,35	10 a 12	13 a 14	Suspeita de Mastite Subclínica
12	400 a 600	+	Subclínica	0,35 a 0,40	13 a 14	0	Mastite subclínica levemente moderada
11	400 a 600	+	Subclínica	0,40 a 0,60	13 a 14	15 a 16	Mastite subclínica moderada
10	820 a 2200	+ a ++	Subclínica	0,75 a 0,95	15 a 16	17 a 20	Mastite Aguda

Os dados da tabela mostram que amostras de leite com contagem de células somáticas entre 10^5 e $3,5 \cdot 10^5$ células/mL, possuem halos de precipitina definidos com 10 a 12 mm de diâmetros, concentrações de albumina igual ou inferior a 0,30 mg/mL,

CMT negativos e sugerem que estes leites são adequados ao consumo. Entretanto, outras amostras com contagem de células somáticas entre 10^5 e $3,5 \cdot 10^5$ células/mL, além de formar halos de precipitina definidos com 10 a 12 mm de diâmetro, formam também

halos difusos de precipitina com 13 a 14 mm de diâmetros, apresentam concentrações de albumina que variam de 0,20 a 0,35 mg/mL e são CMT negativos. Estes resultados interpretados de acordo com a tabela de Philpot e Nickerson (1991), sugerem que estes leites são adequados ao consumo. A interpretação de nossos resultados sugere que algum processo inflamatório e ou infeccioso está em fase de instalação ou instalou-se recentemente em nível das glândulas mamárias dos animais fornecedores desses leites, o que significa que são animais com suspeita de mastite subclínica.

Algumas amostras de leite com contagem de células somáticas de 4.10^5 a 6.10^5 células/mL, formam halos de precipitina bem definidos com 13 a 14 mm de diâmetro e concentração de albumina de 0,35 a 0,40 mg/mL. Outras amostras entretanto, com os mesmos limites de contagem de células somáticas e com os mesmos limites de diâmetro dos halos definidos, formam também halos de precipitina difusos com 15 a 16 mm de diâmetro, concentração de albumina de 0,40 a 0,60 mg/mL. De acordo com a tabela de Philpot e Nickerson (1991) estes leites são de animais com suspeita de mastite, uma vez que são CMT levemente positivo, mas ainda adequados ao consumo. Os nossos resultados sugerem que quando as amostras de leite formam halos definidos de

precipitina, cujos limites são de 13 a 14 mm de diâmetro, os animais produtores desses leites são portadores de mastite subclínica levemente moderada, uma vez que a concentração de albumina plasmática no leite é aproximadamente 2 vezes maior que o valor normal. Quando, além dos halos definidos, são observados halos difusos, os animais são portadores de mastite clínica moderada já que a concentração de albumina plasmática pode ser até 3 vezes maior que o valor normal (Tabela II). As amostras de leite com limites de contagem de células somáticas entre 8.10^5 e 22.10^5 células/mL, são CMT positivo de acordo com a tabela de Philpot & Nickerson (1991). Observa-se a formação halos definidos de precipitina com 15 a 16 mm de diâmetro e, quase sempre, formam halos difusos com diâmetros de 17 a 20 mm ou maior. Os animais produtores de leites com essas características foram enquadrados como animais com mastite aguda ou clínica, porque certamente suas glândulas mamárias estão com intenso processo de inflamação e ou infecção, uma vez que a concentração de albumina pode atingir 0,95 mg/mL.

Assim, baseado nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método de imunodifusão radial é altamente específico e pode diagnosticar mastites subclínicas precocemente com maior segurança que os métodos freqüentemente utilizados atualmente.

Referências bibliográficas

- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- FUNAYAMA, S; GANCEDO, J.M; GANCEDO, C. (1980) Turnover of yeast Fructose biphosphatase in different metabolic conditions. *European Journal of Biochemistry*, 109: 61-66.
- GIESECKE, W.H.; VILJOEN, M.H. (1974) The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows: a comparison of cytological methods and a monovalent radial immunodiffusion test. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research*, 43: 251.
- HONKANEN-BUZALSKI, T.; SANDHOLM, M. (1981) Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrums: correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. *Journal of Dairy Research*, 48: 213-223.
- KIRK, J.H. (1984) Programmable calculator program for linear somatic cell scores to estimate mastitis yield losses. *Journal of Dairy Science*, 67: 441-443.
- KITCHEN, B.J.; MIDDLETON, G. (1976) Enzymic methods for the estimation of the somatic cell count in bovine milk. II N-acetyl-b-D-glucosaminidase test for routine estimation of the somatic cell counts in milk. *Journal of Dairy Research*, 43: 491-494.
- KITCHEN, B.J. (1981) Review of the progress of Dairy Science: bovine mastitis: compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48: 167-188.
- KITCHEN, J.; MIDDLETON, G.; DURWARD, I.G.; ANDREWS, R.J.; SALMON, M.C. (1980) Mastitis Diagnostic Tests to Estimate Mammary Gland Epithelial Cell Damage. *Journal of Dairy Science*, 63: 978-983.
- MANCINI, G; CARBONARA, A.O; HEREMANS, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235-254.
- MATTILA, T; SANDHOLM, M. (1985) Antitrypsin and N-acetyl-b-D-glucosaminidase as markers of mastitis in a herd of Ayrshire cows. *Journal of Veterinary Research*, 46: 2453-2456.
- ÖSTENSSON, K., HAGELTORN, M., ASTROM, G. (1988) Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 29: 493-500.

OUCHTERLONY, O.; NILSSON, I.A. Immunodiffusion and Immunelectrophoresis. In:

WEIR, D. (Ed.) (1978) *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell, p. 19.1-19.44.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: Counter Attack, Naperville II, Babson Bros.Co. (1991) p.150.

SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KANGASNIEMI, R. (1984) Milk trypsin-inhibitor capacity as an indicator of bovine mastitis - a novel principle which can be automated. *Journal of Dairy Research*, 51: 1-9.

SPENCER, G.R.; SIMON, J. (1960) The catalase, California and cell count tests for detecting abnormalities in milk. *American Journal Veterinary Research*, 21: 578.