Luís Ivan Martinhão Souto

Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil

São Paulo

2006

Luís Ivan Martinhão Souto

Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1672
FMVZ

Souto, Luís Ivan Martinhão

Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil / Luís Ivan Martinhão Souto. – São Paulo : L. I. M. Souto, 2006.

84 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Mastite animal. 2. Leite cru. 3. Leite (qualidade). 4. Microbiologia. 5. Bovinos leiteiros. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Associação entre o índice de mastite em rebanhos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru", protocolo nº508/2004, utilizando 1.200 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Association between mastitis in milk herds and the microbiological quality of raw milk", protocol number 508/2004, utilizing 1.200 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 09 de setembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone:/Fax: (011) 3032-2224/3091-7671/3091-7676

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUTO, Luís Ivan Martinhão

Título: Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/_____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Avaliação: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Avaliação: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Avaliação: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Avaliação: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Avaliação: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pela paciência, compreensão e ensinamentos durante a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, Coordenador do Curso de Pós-gradução em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, da FMVZ/USP; pela dedicação incansável.

À Profa. Dra. Mariângela Spotti Lopes Fujita, da UNESP-Marília, pela grande ajuda prestada na elaboração do Projeto de Auxílio à Pesquisa, aprovado pela FAPESP.

À Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, do Setor de Higiene Alimentar, VPS/FMVZ/USP; pelo esclarecimento e ajuda na solução das dúvidas que apareceram durante a elaboração do projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, Prof. Dr. Marcus Amaku e Prof. Dr. Fernando Ferreira, do Laboratório de Bioestatística, VPS/FMVZ/USP; pelos ensinamentos e auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus pais Luís e Constância, que são merecedores de grande parte dos méritos desse trabalho, por sempre me mostrarem que o caminho do conhecimento é aquele que devemos seguir.

Aos meus irmãos Luísa, Eduardo e Ricardo, por entenderem a necessidade de minha ausência para poder concluir este trabalho, e mesmo assim, sempre estarem prontos a oferecer sua amizade.

À minha namorada Renata, pelo companheirismo, paciência e apoio.

À minha tia Márcia e Eduardo, por terem me acolhido em minha chegada a esta cidade, e pelo companheirismo oferecido.

Aos técnicos Regina Alcântara, Sônia Sakata e Dra. Priscilla Melville, do Laboratório de Doenças Infecciosas: bactérias e fungos, do VPS/FMVZ/USP; pelo apoio prestado sempre que solicitado.

Aos colegas de Laboratório Clarice, Roberto Raia, Gisele, Simone Costa, Mônica, Vanessa, Patrícia, Jeniffer, Leslie, Anna Catharina e Cristiana, pela ajuda e companheirismo durante esta etapa de minha vida.

Aos estagiários Márcio, Carlos Eduardo, Andréia, Daniel, Cátia, Mara, Sílvia, Adriana, Douglas, Mateus e Fabiana, pelo esforço e dedicação.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa da Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAPGAMA), pelo apoio oferecido a este trabalho.

Ao técnico Marco Lázaro e Dr. Felício Garino Jr., do NAPGAMA, pelo acompanhamento na fase inicial do Projeto.

Aos Estagiários, Funcionários, Residentes, Pós-Graduandos e Professores do Setor de Clínica de Grandes Animais, do Hospital Veterinário, do FMVZ/USP; pela gentileza de ceder animais para coleta de sangue sempre que foi necessário.

Aos Secretários Cristina, Danival e Virgínia, do VPS/FMVZ/USP; pela presteza e amizade.

Aos técnicos Sandra Sanches e Orlando Bispo, e Profa. Dra. Simone de Carvalho Ballian, do Setor de Higiene Alimentar, do VPS/FMVZ/USP; por me esclarecerem as dúvidas nos vários momentos que foram preciso.

Aos colegas de colheita de amostras, Dr. Ademir de Lucas, Dr. Eugênio Yokoya, Alfredo Melo, Dr. Borges, Rogério, Dra. Danielle Daher, Dr. Ferrari e Dr. Roberto Mangeri, pela doação de tempo, sem cobrança alguma.

À Cooperativa de Laticínios de São José dos Campos, Prefeitura de Jacareí, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo,

Cooperativa dos Produtores Agropecuários de São Pedro, *Dairy Partners Americas* – Nestlé, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Carlos, pela disponibilização das propriedades.

Aos Produtores de Leite que permitiram nossa “invasão” e que se mantêm tão fieis a esta atividade trabalhosa e muitas vezes tão pouco valorizada em nosso país. Talvez só a paixão possa justificar a persistência das pessoas que insistem em continuar nesta Atividade Econômica.

Aos colegas de Pós-graduação Adriana Cortêz, Adriano Pinter, Alessandra Nava, Alessandra Ragozzo, Alexandre Ataliba, Alexandre Tomaz, Aline Resende, Amani Gonçales, Camila Baltazar, Carlos, Cristiene Rosa, Cristina Brito, Cristina Dib, Daniel Aguiar, Daniela Chiebao, Daniela Ribeiro, Eliana Villalobos, Esther Matsubara, Eugênia, Fábio Gregori, Flávia Leme, Guacyara Cavalcante, Iara Silveira, Juliana Chen, Lara Borges, Laura Villareal, Leandro Basile, Leandro Moretti, Letticie Ruiz, Luiz César, Marcos, Pancho, Patrícia Bertola, Patrícia Ferreira, Paula, Paulo Brandão, Renata Paixão, Renata Pucci, Ricardo Cabrera, Richard Pacheco, Sandra Nishi, Sérgio Azevedo, Sílvio Pereira, Simone Ambrósio, Simone Miyashiro, Tatiana Ueno; por tornar essa “caminhada” mais agradável.

Aos Funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Cláudia, Deise, Joana e Sandra, da FMVZ/USP; que sempre atenderam com muita eficiência.

Aos Funcionários da Biblioteca Virginie Buff D’Ápice da FMVZ/USP; pelo bom atendimento prestado em todos os momentos necessários.

Aos Funcionários e Professores do VPS/FMVZ/USP: pela companhia e conhecimento compartilhado.

Aos Funcionários da FMVZ/USP; pelo tratamento cordial, educação e alegria de todos os dias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da Bolsa de Estudo (Processo nº 141536/2002-0).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, através do Projeto de Auxílio à Pesquisa (Processo nº 03/04785-0).

A todas as outras pessoas, que não foram poucas, e que de alguma forma ajudaram este trabalho a se concretizar.

"A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras" (Albert Einsten).

RESUMO

SOUTO, L. I. M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil.** [Association between mastitis rate in bovine dairy herd and the raw milk microbiological quality in São Paulo State, Brazil]. 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis correlações entre os índices de mastite e a qualidade microbiológica do leite cru, em 36 propriedades com atividade exploratória leiteira, no Estado de São Paulo, Brasil. Examinou-se 4662 quartos mamários de 1180 animais em lactação para se verificar a presença de mastite pelos Testes de Caneca de Fundo Escuro e CMT, e coletou-se uma amostra de cada quarto mamário positivo em pelo menos um dos testes para exame microbiológico. Para se avaliar a qualidade microbiológica do leite cru, coletou-se uma amostra de cada propriedade e fez-se a Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis, Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios facultativos viáveis, Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis, Contagem de *Enterococcus* spp., Contagem de *Stapylococcus* spp., Contagem de *Streptococcus* spp., Contagem de *Corynebacterium* spp., Contagem de bolores e leveduras, Número Mais Provável de coliformes totais e Número Mais Provável de coliformes fecais. Aplicou-se teste de Correlação de Pearson e Regressão Linear. Para comparação entre os índices de mastite, a melhor correlação foi entre o índice de resultados positivos ao teste CMT e os casos de mastite por causa infecciosa ($r = 0,920$ e $R^2 = 84,7\%$). Comparando-se o índice de mastite e a qualidade microbiológica do leite cru, o melhor resultado que apresentou correlação significativa foi entre o índice de casos de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis ($r = 0,522$ e $R^2 = 27,3\%$). Pelo baixo número de análises que apresentaram resultado de Correlação significativa, notou-se que o índice mastite em rebanhos bovinos leiteiros não interfere na qualidade microbiológica do leite cru, nas condições estudadas neste experimento.

Palavras-chave: Mastite animal. Leite cru. Leite (qualidade). Microbiologia. Bovinos leiteiros.

ABSTRACT

SOUTO, L. I. M. **Association between mastitis rate in bovine dairy herd and the raw milk microbiological quality in São Paulo State, Brazil.** [Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil]. 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The purpose of this research was to investigate the possible correlations between the mastitis rate and raw milk microbiology quality, from 36 dairy farms, in São Paulo State, Brazil. It was investigated 4662 mammary quarters of 1180 lactant animals to examine mastitis cases using Tamis test and CMT. It was collected one sample of each positive mammary quarter in one test at least to microbiological analysis. To estimate the raw milk microbiological quality, it was colected one sample from each farm and realized one aerobic plate count of microorganisms mesophilic, aerobic plate count of microorganisms psychrotrophic, aerobic plate count of microorganisms termophilic, *Enterococcus* spp. plate count, *Stahylococcus* spp. plate count, *Streptococcus* spp. plate count, *Corynebacterium* spp. plate count, Yeast and Molds plate count, Most Probable Number of coliforms, Most Probable Number of fecal coliforms. It was used Pearson Correlation test and Linear Regression. In order to compare mastitis rates, the best correlation was between positives CMT test rate and the cases of mastitis caused by infections disease ($r = 0,920$ and $R^2 = 84,7\%$). Analysing the mastitis rate and the raw milk microbiological quality, the best result of correlation was between *Staphylococcus* mastitis rate and the aerobic plate count of microorganisms termophilic ($r = 0,522$ e $R^2 = 27,3\%$). Because of the low number of significant correlation, it was observed that the mastitis heard in dairy bovines herds do not interfere in raw milk microbiological quality, in the condition of this experiment.

Key-words: Animals mastitis. Raw milk. Milk (quality). Microbiology. Dairy herds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da metodologia utilizada para o isolamento de microrganismos dos casos de mastite..... 40

Figura 2 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem de microrganismos em profundidade..... 44

Figura 3 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem de microrganismos em superfície..... 45

Figura 4 - Representação esquemática da técnica de Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais..... 47

Figura 5 - Representação esquemática da técnica de Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais..... 49

Figura 6 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e CMT..... 59

Figura 7 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite infecciosa.. 59

Figura 8 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite por *Corynebacterium* spp. 60

Figura 9 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite por causa não infecciosa..... 60

Figura 10 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite infecciosa..... 61

Figura 11 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Staphylococcus* spp 61

Figura 12 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Streptococcus* spp. 62

Figura 13 - Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Corynebacterium* spp. 62

Figura 14 - Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Staphylococcus* spp. 63

Figura 15 - Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Streptococcus* spp. 63

Figura 16 - Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Corynebacterium* spp. 64
Figura 17 - Análise de Regressão Linear entre o índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis..... 66
Figura 18 - Análise de Regressão Linear entre índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de *Corynebacterium* spp. ... 67
Figura 19 - Análise de Regressão Linear entre índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de bolores e leveduras..... 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cidades participantes do Experimento e número de propriedades visitadas..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos totais de análises dos exames de mastite e suas porcentagens médias..... 54

Tabela 2 - Número mínimo, máximo e mediana dos resultados das análises de mastite..... 56

Tabela 3 - Número mínimo, máximo e mediana dos resultados das análises de leite cru..... 57

Tabela 4 - Resultado das análises de Correlação de Pearson e Coeficiente de Determinação da Reta dos casos de mastite estudados..... 58

Tabela 5 - Resultado das análises de Correlação de Pearson e Coeficiente de Determinação da Reta entre os índices de mastite e as contagens de microrganismos no leite cru..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	*American Public Health Association*
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPA	Boas Práticas Agrícolas
ºC	grau Celsius
CMT	*Californian Mastitis Test*
cél./mL	células por mililitro
CCS	Contagem de Células Somáticas
Cód.	código do produto
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECS	Escore de Células Somáticas
IN	Instrução Normativa
ML	mililitro
Mm	milímetro
NMP	Número Mais Provável
Nº	número
%	porcentagem
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
RNA	Ácido Ribonucléico
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UHT	*Ultra High Temperature*
U.S. FDA	*United States Food & Drug Administration*

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 19
2 **REVISÃO DE LITERATURA**..... 20
2.1 MASTITE..... 20
2.1.1 **Contagem de Células Somáticas (CCS)**..... 23
2.1.2 **Prejuízos que a mastite causa à qualidade do leite**..... 24
2..1.3 **Tratamento com antibiótico**..... 29
2.2 RELAÇÃO ENTRE MASTITE E LEITE DO TANQUE DE RESFRIAMENTO..... 31
2.3 QUALIDADE DO LEITE..... 31
2.4 UTILIZAÇÃO DE PCR PARA A DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS..... 36
3 **OBJETIVOS**..... 37
4 **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 38
4.1 ESCOLHA DAS PROPRIEDADES..... 38
4.2 MASTITE..... 39
4.3 LEITE CRU..... 41
4.3.1 **Coleta e armazenamento do leite cru**..... 41
4.3.2 **Análise microbiológica do leite cru**..... 41
4.3.2.1 Diluição das amostras..... 42
4.3.2.2 Técnicas de contagem e estimativa de microrganismos no leite cru 42
4.3.2.2.1 *Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis (Contagem Padrão em Placas – CPP)*..... 42
4.3.2.2.2 *Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios facultativos viáveis*..... 43
4.3.2.2.3 *Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis*..... 43
4.3.2.2.4 *Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais*..... 46
4.3.2.2.5 *Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais*..... 46
4.3.2.2.6 *Contagem de Stapylococcus spp*. 48
4.3.2.2.7 *Contagem de Enterococcus spp.* 48

4.3.2.2.8 *Contagem de Streptococcus spp.* 50
4.3.2.2.9 *Contagem de Corynebacterium spp.* 50
4.3.2.2.10 *Contagem de bolores e leveduras*..... 51
4.3.2.3 Sensibilidade dos testes de quantificação de microrganismos no leite cru..... 51
4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 52
5 **RESULTADOS**..... 53
5.1 MASTITE..... 53
5.2 LEITE CRU..... 55
5.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DE MASTITE..... 57
5.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DE MASTITE E AS DIFERENTES TÉCNICAS QUANTITATIVAS DO LEITE CRU..... 64
6 **DISCUSSÃO**..... 68
7 **CONCLUSÕES**..... 74
REFERÊNCIAS..... 75

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de alto valor nutritivo, servindo como única fonte de nutrientes dos mamíferos na fase inicial de suas vidas. A disponibilidade de tantos nutrientes propicia o desenvolvimento de microrganismos e prejuízo à qualidade do produto.

Mastite é o processo inflamatório da glândula mamária. A inflamação do tecido glandular leva a alteração da composição do leite devido à alteração da permeabilidade celular. Diversas razões podem levar ao aparecimento da mastite, sendo a mais comum, a infecção do úbere por microrganismos. Estes agentes são capazes de colonizar o tecido mamário e utilizar o leite como fonte de nutrientes para seu desenvolvimento, causando prejuízos à composição química deste alimento.

Com o desenvolvimento tecnológico, a busca por melhoria de qualidade de produtos e processos se tornam fundamentais para o desenvolvimento de um setor econômico e por sua competitividade no mercado globalizado. Em 2002, a Instrução Normativa Nº 51, aprovou regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite no Brasil.

A presença de microrganismos na glândula mamária sugere uma maior carga microbiana no leite e conseqüente perda de qualidade. A relação entre o índice de mastite em rebanhos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru é feita de maneira indireta por meio de contagem de células somáticas e quantificação de nutrientes ou pela contagem total de microrganismos presentes neste alimento.

Foi proposto, usando-se metodologias simples e usuais avaliar a relação entre o índice de mastite em rebanhos leiteiros bovinos e a qualidade microbiológica do leite cru de maneira ainda não realizada. Esta pesquisa analisou se as metodologias oficiais de avaliação da quantidade de microrganismos no leite cru são capazes de refletir o índice de mastite do rebanho. Os dados obtidos são de grande importância científica por apresentar estudos de relações ainda não empregados no modelo proposto, o que pode servir de padrão para futuros trabalhos científicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O leite é um alimento de alto valor nutritivo, contendo gorduras, proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas e oligoelementos. Um litro de leite por dia supre a necessidade protéica de crianças com até seis anos de idade, mais de 60% da necessidade protéica dos adolescentes e 50% da dos adultos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de pelo menos 500 mL de leite por dia (COSTA, 1999a).

2.1 MASTITE

Mastite é a nomenclatura usada para designar o processo inflamatório da glândula mamária. Inflamação é um termo utilizado há mais de 2.000 anos e é assim mencionado, pelo calor da área inflamada ser comparado com a combustão dos corpos. Pode ser definida como a resposta do organismo a alguma lesão do tecido ou célula, desencadeando reações celulares, humorais e vasculares. Rubor, tumor, calor e dor são os 4 sinais fundamentais da inflamação descritos por Celsus, no primeiro século antes de Cristo. O distúrbio da função foi o outro sinal acrescentado por Galeno, 130 anos depois de Cristo (FARIA, 1971; ROBBINS, 1974; THOMSON, 1983).

De acordo com Faria (1974, p. 69),

> [...] no processo inflamatório ocorrem em seqüência cronológica alterações ou lesões celulares e teciduais, distúrbios circulatórios e fenômenos proliferativos reparadores. Para Marchand e Lubarsch, é todo este conjunto de alterações que caracteriza a inflamação. Este é o conceito também adotado por nós. Se cada fenômeno aparecer isoladamente, por ex., só as alterações celulares, ou só o distúrbio circulatório hiperêmico, não se pode falar de inflamação.

Pode-se classificar os processos inflamatórios infecciosos em doenças clínicas e subclínicas. As primeiras são aquelas que apresentam alterações fisiológicas e morfológicas anormais, causando dor, desconforto ou estresse, demonstrando evidentemente sinais clínicos. O termo subclínico aplica-se a mastite e algumas outras doenças infecciosas, e o hospedeiro pode disseminar o microrganismo envolvido, não apresentando evidências clínicas, podendo a presença do agente agressor ser detectado apenas por testes complementares (THOMSON, 1983).

O processo inflamatório da glândula mamária pode ser originado por alguma falha de gerenciamento, incluindo nutrição, higiene, genética e condições ambientais. Pode-se classifica-lo de acordo com a severidade em casos clínicos e subclínicos. Mastite clínica é aquela em que já se evidenciam os quatro sinais de inflamação e o leite apresenta-se de maneira grosseiramente alterado, com formação de coágulos e presença de fibrina na secreção, podendo ser detectado pelo teste da caneca de fundo escuro. Mastite subclínica é verificada por testes que identificam presença de leucócitos no leite, direta ou indiretamente. Nas duas situações observa-se diminuição de produção de leite, mas na primeira circunstância a perda é muito superior (CULLOR; TYLER,1996; PARKER, 1981; QUINN, 1980; REBHUN, 2000).

Della Libera (1998) verificou que amostras de leite de glândulas mamárias com Contagem de Células Somáticas (CCS) acima de 500.000 cél./mL apresentam maior positividade ao teste CMT, pH mais alcalino e teores de cloretos mais elevados do que amostras com CCS abaixo de 500.000 cél./mL.

A etiologia da mastite infecciosa pode se apresentar bastante variada. *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. são os principais microrganismos envolvidos no processo inflamatório da glândula mamária. Outros agentes, como *Enterobacteriaceae*, fungos filamentosos e leveduras também são encontrados (COSTA et al., 1986).

Os agentes infecciosos causadores de processos infecciosos da glândula mamária podem ser dividido em duas categorias: contagiosos e ambientais. Os microrganismos contagiosos são aqueles que estão bem adaptados ao tecido mamário e se alastram por de procedimentos de ordenha que possibilitem o contato

do material infectado com o animal sadio, são exemplos deste grupo *Staphylococccus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* spp. Os ambientais são aqueles que estão presentes no ambiente ao qual o animal tem acesso e infectam a glândula mamária pelo contado do orifício do teto com o agente infectante, são exemplos deste grupo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* spp., *Proteus* ssp., *Pseudomonas* spp., *Stahyphylococcus* coagulase-negativos, *Streptococcus* ambientais, leveduras ou fungos, *Actinomyces pyogenes* e *Corynbebacterium bovis* (REBHUN, 2000). Cullor e Tyler (1996) destacam que infecções intramamárias causadas por organismos considerados comensais colonizando a glândula mamária, podem proporcionar proteção do tecido contra os considerados patógenos maiores. *Corynebacterium* bovis e *Staphylococcus* coagulase negativa podem deter a entrada de *Staphylococcus aureus*.

Um importante fator que influi no índice de mastites provocadas por microrganismos ambientais é a sazonalidade. Durante os meses de maior precipitação pluviométrica e mais quentes, ocorrem mais casos de mastites ambientais. Outros fatores relacionados ao ambiente como falta de higiene podem interferir no índice deste tipo de infecção da glândula mamária (RIBEIRO et al., 2001).

A distância da base do teto ao solo é um importante fator de risco para mastite, sendo que quanto mais próximos a superfície do terreno, maior o fator predisponente a infecção (BOLGOV, 1997).

Costa et al. (2001) estudaram a relação entre os casos de mastite clínica e sub-clínica em 237 rebanhos. Em rebanhos em que o principal agente etiológico é *Corynebacterium bovis* nota-se maior ocorrência de mastite subclínica e menor de mastite clínica, já em rebanhos onde o agente etiológico predominante é *Staphylococcus* coagulase positivo observa-se maior ocorrência de mastite clínica e menor de subclínica.

2.1.1 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Um método utilizado para se controlar a qualidade microbiológica do leite é por meio da contagem de células somáticas. Este método pode ser afetado por vários fatores, entre eles, a idade do animal, raça, número de ordenhas diárias e período da lactação. A presença de infecção na glândula mamária é o que mais influencia o aumento do número de células somáticas, podendo-se utilizar este parâmetro como indicador indireto da presença da infecção. No entanto, é importante lembrar que esta metodologia poderá estar indicando um processo inflamatório de causa não infecciosa. (HILLERTON, 1999; SMITH; HOGAN, 1999).

O *California Mastitis Test* (CMT) é um exame indireto muito utilizado para diagnóstico de mastite a campo. Este teste apresenta correlação (r = 0,9638) com a contagem de células somáticas, demonstrando sua alta eficiência (THIERS et al., 1999). Jorge et al. (2005) comparam o teste CMT e a contagem de células somáticas de leite de búfalas e observaram correlação positiva e significativa (r = 0,53). Porém, quando comparou-se o teste de CMT e contagem de células somáticas com a composição e produção de leite de búfalas não se observou correlação.

Zafalon et al. (1999) descreveram que infecções causadoras de mastite subclínica, ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase positivos, *Staphylococcus* coagulase negativos e *Corynebacterium* sp, tiveram aumento significativo da contagem de células somáticas e diminuição na produção de leite.

Apesar de apresentar baixo custo e ser de fácil execução, há uma discussão quanto à padronização da contagem de células somáticas no leite. Existe uma relação entre a contagem de células somáticas no tanque de expansão e a porcentagem de quartos mamários infeccionados, onde rebanhos com índices de mastite de 6,2%, 12,8%, 24,3% e 32,6% apresentam contagem de células somáticas de 200.000, 400.000, 750.000 e 1.000.000 de células/mL, respectivamente. A União Européia aceita até 400.000 células/mL no tanque de expansão, ou seja, um índice aproximado de 12-13% de quartos mamários infectados. Já os Estados Unidos aceitam até 750.000 células/mL, ou seja, aproximadamente 25% de quartos

mamários infectados (uma média de um quarto mamário com mastite para cada animal em produção). Vários pesquisadores afirmam que quartos mamários que secretam leite com menos de 200.000 células/mL raramente estarão infectados por algum tipo de microrganismo. O aumento da contagem de células somáticas no tanque de expansão aumenta o risco de resíduo de antibiótico no leite. O *Codex Alimentarius Comission* não prevê nenhum limite para a contagem de células somáticas, portanto é necessário que se façam estudos para estabelecer limites aceitáveis, a fim de se obter um melhor parâmetro para monitoramento da qualidade do leite cru (HILLERTON, 1999; SMITH; HOGAN, 1999).

Schukken et al. (1989) observaram que a estimativa anual de mastite clínica em rebanhos com contagem de células somáticas menor que 150.000 cel./mL chega a 17,9 casos por 100 animais. O microrganismo mais freqüentemente isolado foi *Escherichia coli* (16,2 %), seguido de estafilococos coagulase negativa (13,0 %). A variação da ocorrência da doença mostra-se sazonal, ocorrendo também variação entre os grupos de microrganismos durante as diferentes estações do ano. Um alto índice de mastite clínica pode ocorrer em rebanhos com baixa contagem de células somáticas devido à ocorrência de microrganismos pouco patogênicos, como estafilococos coagulase negativa.

Noro et al. (2004) encontraram, na região Noroeste do Rio Grande do Sul, Escore de Células Somáticas (ECS) médio da transformação do logaritmo igual a 3,57 $\pm$ 1,95, inferiores aos observados em outras regiões do Brasil. Mostram que o mês do controle leiteiro, estágio de lactação, idade do parto e mês do parto têm efeito significativo sobre ECS.

2.1.2 Prejuízos que a mastite causa à qualidade do leite

Costa (1998a) relata que a mastite causa diminuição na produção de leite e que o prejuízo estimado pela mastite em propriedades brasileiras é de 332,00 dólares/vaca/ano, sendo superior ao observado em outros países (nos EUA, por exemplo, a média é de 200 dólares/vaca/ano).

O processo inflamatório da glândula mamária provoca uma diminuição na produção de leite, que pode variar de 5,3% a 21,2%, conforme o grau de severidade da doença. Quartos mamários afetados refletem uma menor porcentagem de sólidos totais, teor de gordura, sólidos não gordurosos e lactose (ASHWORTH; FORSTER; LUEDECKE,1967; DANIEL; BIGGS; BARNUM, 1966; NG-KWAI-HANG et al., 1983). A maior atividade de lipases leva à diminuição dos valores de ácidos graxos e menor concentração de fosfolipídeos. Leites provenientes de glândulas afetadas possuem maior concentração de ácidos graxos livres de cadeias curtas (4 a 12 carbonos) e menor concentração de ácidos graxos de cadeias longas (16 a 18 carbonos) (RANDOLPH; ERWIN, 1974). A diminuição do teor de gordura e sólidos não gordurosos apresenta relação com o grau de severidade da doença, ou seja, quanto mais grave a patologia, menor o teor de gordura e sólidos não gordurosos (PHILPORT, 1967).

O processo inflamatório da glândula mamária eleva consideravelmente a contagem de células somáticas no leite cru, e isto aumenta significativamente a lipólise e proteólise, além de provocar aumento da chamada “lipólise espontânea” que ocorre no leite cru armazenado em tanque de expansão. No período de pré-infecção a contagem é menor que no período pós-infecção. O leite com maior número de células somáticas tem a vida de prateleira diminuída e os padrões de qualidade alterados. Mesmo após a pasteurização, a qualidade do leite com alta contagem de células somáticas é afetada durante o período de estocagem (MA et al., 2000; MURPHY et al., 1989).

Ruegg e Tabone (2000) observaram que em rebanhos com alta contagem de células somáticas, o risco de resíduo de antibiótico no leite é aumentado. Os autores alertam para a importância de um programa de controle de mastite para que este risco seja diminuído, já que este é um Ponto Crítico de Controle no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Weaver e Kroger (1977) observaram que o teor de proteína total e proteína não caseínica (proteína do soro de leite) no leite considerado normal para a contagem de células somáticas (até 1.000.000) é menor do que naquele considerado anormal (> 1.000.000). A alta contagem de células somáticas provoca um aumento de 6 a 20%

no teor de proteína em relação ao leite considerado normal. Os autores não encontraram diferença significativa entre os teores de caseína, apesar da literatura mostrar que com o aumento da contagem de células somáticas ocorre diminuição da concentração de caseína.

Rogers e Mitchell (1994) demonstraram que a alta carga microbiana no leite influi na elaboração de produtos lácteos. Eles compararam leite com contagem de células somáticas <250.000 cel./mL, de 250.000 a 499.999 cel./mL e >500.000 cel./mL para elaboração de queijo Cheddar e iogurte desnatado. Notaram que para o iogurte desnatado, a grande alteração que ocorreu foi organoléptica, para produtos elaborados com matéria-prima com contagem > 250.000 cel./mL. Já quando usado leite com contagem > 500.000 cel./mL para a elaboração de queijo Cheddar, além de se ter um decréscimo no rendimento da produção, observa-se um maior conteúdo de umidade e grau de proteólise, e diminuição do sabor e grau de textura.

É comum observar a presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos crus, especialmente em produtos de origem animal. Leite cru e produtos lácteos não pasteurizados podem conter um grande número de estafilococos, freqüentemente resultado de mastite estafilocócica. A enterotoxina produzida não é inativada com a destruição da célula microbiana (LANCETTE; BENNETT, 2001). *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias de rebanhos leiteiros podem apresentar características bioquímicas atípicas, ou seja, nem sempre apresentarão comportamento bioquímico clássico, como por exemplo, reação de coagulase positiva. *Staphylococcus aureus* está amplamente distribuído em rebanhos leiteiros e provavelmente causando alta contaminação do leite cru. Sugere-se que o limite de *Staphylococcus aureus* em leite cru para a produção de queijo seja de 1.000 UFC/mL (ZECCONI; HAHN, 1999). As enterotoxinas produzidas por bactérias do gênero *Staphylococcus* não são destruídas nem mesmo à fervura por 15 minutos. Em estudo realizado com 127 cepas de *Staphylococcus* spp, verificou-se que além de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus chromogenes* produziram enterotoxina, mostrando assim, que outras espécies do gênero *Staphylococcus*, além do *Staphylococcus aureus* podem representar potencial risco a saúde do consumidor (BRABES et al., 1999). Uma pesquisa feita no estado de Minas Gerais com 127 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de

mastite identificou 60 (47,2%) cepas produtoras de toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Os autores ressaltam a importância desta toxina em saúde pública pela sua alta capacidade de resistir ao processo térmico de pasteurização (SILVA et al., 1999).

Em estudo feito para verificar se estirpes de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina diferiam de linhagens isoladas de fezes de fêmeas bovinas, verificou-se que não havia diferença significativa para produção de colicina, colicina 5, verotoxina e crescimento em soro de leite normal. Apesar de haver diferença significativa entre a habilidade de fermentar adonitol, para a produção de aerobactina e para o crescimento em soro de leite mastítico, essas propriedades parecem não ser marcadores de virulência nem fatores de virulência potencial. As *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina não são um grupo que possui atributos especiais de virulência (NEMETH; MUCKLE; GYLES,1994). *Escherichai coli* consideradas enteropatogênicas para gastroenterite infantil foram encontradas em freqüência de 24,20%, isoladas de amostras de leite provenientes de animais comprovadamente com mastite (BOTTINO; HIPÓLITO, 1973).

Listeria monocytogenes e *Campylobacter* sp são gêneros de microrganismos capazes de causar malefícios à saúde humana. Podem ser causadores de mastite, representando o consumo de leite cru, um perigo ao consumidor (LANGONI, 1997a; LANGONI et al., 1997b).

Costa et al. (1999b) testaram 16 amostras de *Nocardia* sp à pasteurização lenta e rápida, isoladas de casos de mastite bovina de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo e Minas Gerais. Observaram que 14 cepas foram resistentes à pasteurização rápida (75ºC/ 20 segundos) e 13 cepas foram resistentes à pasteurização lenta (65ºC/ 30 minutos). Este agente causa uma lesão granulomatosa que pode levar à perda da glândula mamária, representando além do risco a saúde dos consumidores do leite contaminado, um prejuízo econômico pela perda do quarto mamário. Melville et al. (2002) descreveram mudanças na estrutura da parede celular de *Prototheca zopfii* quando expostas a sulfato de cobre e nitrato de prata, e alterações citoplasmáticas quando submetidas à exposição pelo clorexidine. Souto et al. (2004) relataram um surto de mastite em uma propriedade

no Estado de São Paulo por *Nocardia* spp., afetando 6,60% dos quartos mamários em produção, apresentando risco à saúde do consumidor e prejuízo econômico para a atividade de produção leiteira.

Costa et al. (1998b) descreveram um relato de caso de toxinfecção alimentar em uma propriedade com índice de mastite por *Prototheca* sp de 37,56%. O proprietário havia consumido massa de queijo feita com o leite infectado e amostras de fezes foram coletadas antes e após o consumo. *Prototheca* sp foi isolada apenas nas amostras fecais coletadas após a ingestão de queijo. A pessoa relatou distúrbio gastrointestinal com aumento de freqüência de defecações e fezes apresentando alterações em suas características (volume e consistência) após o consumir o produto.

Benites, Costa e Melville (2002) verificam o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de leite provenientes de glândulas mamárias apresentando mastite subclínica infectadas naturalmente. Concluem que a contagem de *Streptococcus* sp (144.500 UFC/mL) é estatisticamente superior a de *Staphylococcus* sp (47.500 UFC/mL) e *Corynebacterium* sp (6.350 UFC/mL). Mostram ainda que o número de unidades formadoras de colônias por mililitro de *Staphylococcus* sp é significativamente superior ao de *Corynebacterium* sp. Isto indica que bactérias causadoras de mastite do gênero *Streptococcus* representam maior número na contagem total de microrganismos no tanque de expansão que aquelas dos gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, e que bactérias do gênero *Staphylococcus* representam maior quantidade no leite cru do rebanho que as do gênero *Corynebacterium.*

Bueno et al. (2005) analisaram a CCS e teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de leite cru armazenado em tanques de refrigeração por expansão direta de uso individual no Estado de Goiás. Verificaram que a CCS apresenta correlação inversa com a concentração de proteína, lactose e sólidos totais. Observaram também que o aumento da temperatura ambiente apresenta correlação positiva com o Escore de Células Somáticas, sendo que a média de CCS é maior no período das secas.

Gebler, Puchajda e Czaplicka (1997) relataram que o aumento da CCS está relacionado a diminuição do teor de lactose e aumento do pH no leite. Mostraram ainda que a CCS está diretamente correlacionada ao resultado do teste CMT.

Santos, Ma e Barbano (2003a) verificaram que o aumento da CCS e da temperatura de estocagem de leite fluído, causam aumento da proteólise e lipólise, levando a diminuição do tempo de vida de prateleira do produto.

Santos et al. (2003b) demonstraram que a atividade de enzimas lipolíticas e proteolíticas nativas de leite desnatado (2% de gordura) submetido a pasteurização pode produzir lipólise e proteólise identificadas por meio de análise sensorial.

2.1.3 Tratamento com antibiótico

Cruz et al. (2004) descreveram uma *blitz* terapia parcial em dois rebanhos no Estado de Minas Gerais, mostrando que o tratamento foi eficaz contra *Streptococcus agalactiae* (100% dos casos) e pouco eficaz para *Staphylococcus aureus* (39,10% dos casos). Atribuem a provável causa de baixa eficácia do tratamento a características de virulência, capacidade de colonização e destruição de camadas mais profundas da glândula mamária e formação de microabcessos e tecido fibroso, como fatores que dificultam o acesso de antibióticos e das células de defesa ao sítio da infecção, conforme descrito por Fonseca e Santos (2000).

Hanway, et al. (2005) observaram que leite com presença de penicilina G, quando tratado com peróxido de hidrogênio e tratamento térmico (54ºC por 3 horas) e/ou pasteurização, apresenta redução significativa nos níveis deste antibiótico, podendo chegar próximo ou abaixo da concentração mínima preconizada pelo U.S. FDA (5 ppb) dependendo da combinação de concentração de peróxido e tratamentos térmicos.

Sérieys et al. (2005) estudaram tratamento sistêmico e intramamário de mastite clínica, causada por bactérias em vacas leiteiras. Observaram que não havia diferença significativa entre os dois grupos tratados. Mostram que os dois tratamentos causam redução da CCS para um limiar abaixo de 250.000 cél./mL. Destacam que uma vantagem do tratamento sistêmico é o efeito do antibiótico em infecções subclínicas presentes em outros quartos mamários.

Vasil e Venglowský (1997) mostraram que métodos preventivos e o uso de antibióticos para tratamento de animais reduziu o índice de mastite causado por bactérias de 47,3 para 1,9% em um período de 19 meses.

Raia et al. (1999) testaram penicilina G procaína e cefacetril para o tratamento de mastite e verificaram que havia resíduo dos dois medicamentos no leite dos animais após período de descarte indicado pelo fabricante, o que representa risco à saúde do consumidor.

Langoni et al. (1999) testaram associação entre ampicilina e cloxacilina em casos de mastite clínica e subclínica causadas por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e observaram uma cura microbiológica de 82,93% e 80,70% para casos de infecções subclínicas e clínicas, respectivamente. Os autores recomendam a utilização deste medicamento para o tratamento das mastites, por atuarem sobre os principais agentes desta afecção.

Langoni, Mendonça e Develley (2000a) sugeriram que tratamento para mastite subclínica de gentamicina associado à bomexina tem ação favorável em relação a procedimentos terapêuticos que utilizam apenas gentamicina.

Langoni et al. (2000b) avaliaram a eficácia da cefapirina benzatina para o tratamento de casos de mastite subclínica, na interrupção da lactação, que apresentaram resultados de CMT positivos com reação (+++), com isolamento de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, e *Corynebacterium* sp. Consideraram que a cefapirina benzatina demonstrou excelente ação, quando avaliada a taxa de cura e recomendam o tratamento para casos de mastite subclínica na secagem.

Langoni et al. (2001) estudaram a eficacia da enrofloxacina no tratamento intramamário e sistêmico de mastite bovina de origem ambiental durante um surto ocorrido em propriedade leiteira, e concluíram que o medicamento foi eficiente nas duas formas testadas (intramamário e sistêmico).

2.2 RELAÇÃO ENTRE MASTITE E LEITE DO TANQUE DE RESFRIAMENTO

Hayes et al. (2001) fizeram a contagem total, identificação e caracterização de microrganismos em tanques de resfrigeração. A contagem padrão em placa variou de 14.000 a 600.000 UFC/mL, sendo que em 15 das 20 amostras coletadas não ultrapassaram 100.000 UFC/mL. Das 20 contagens, 12 estavam associadas a *Streptococcus*, 4 com microrganismos Gram negativos, 2 com *Streptococcus* e microrganismos Gram negativos, e 2 não identificados. Eles destacam ainda que não se observa correlação entre a contagem padrão em placas e a contagem de células somáticas.

Phuektes et al. (2003) encontraram relação entre a Contagem Total de Bactérias e a presença de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos com contagem acima de 50.000 UFC/mL (p=0,045) quando comparados a rebanhos com Contagem acima de 50.000 UFC/mL. Esta relação porém, não era observada quando se comparava os dois grupos de Contagens com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. Quando comparadas as quatro espécies de bactérias do estudo com a Contagem de Bactérias Termodúricas nos tanques, não observaram diferença significativa, dividindo-se as Contagens em dois grupos, um acima de 1.000 UFC/mL e o outro abaixo de 1.000 UFC/mL.

2.3 QUALIDADE DO LEITE

Senyk et al. (1988) analisaram sete métodos de plaqueamento, a saber: contagem padrão em placas, contagem de bactérias psicrotróficas, contagem rápida de mirorganismos psicrotróficos, contagem preliminarmente incubada, contagem de microrganismo mesófilos em placa, contagem laboratorial de leite pasteurizado, e

contagem de coliformes por ágar bile violeta vermelho, para o monitoramento de leite cru em quatro diferentes temperaturas (1,7; 4,4; 7,2 e 10,0ºC), após dois períodos de estocagem (24 e 48 horas). Observaram que para contagem laboratorial de leite pasteurizado não havia aumento significativo da contagem de bactérias nas quatro temperaturas estudadas para os dois períodos; o mesmo ocorria para a contagem de microrganismos mesófilos no período de 24 horas. Os métodos de plaqueamento apresentaram correlação entre os períodos e temperaturas estudados.

Brito et al. (2004) descreveram sobre a estruturação de um programa de treinamento para produção de leite seguro. Demonstraram a importância de treinamento e utilização de metodologias como BPA e APPCC para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. Discutiram a importância de cuidados a serem tomados no manejo das bezerras na fase de recria, cuidado no armazenamento dos alimentos para evitar contaminação com fungos produtores de micotoxinas, realização de testes para o controle da tuberculose, monitoração e controle de mastite com ênfase na antissepsia de tetos e o tratamento da vaca seca, uso prudente de antibióticos, anti-helmínticos e carrapaticidas em vacas em lactação, higienização adequada dos equipamentos de ordenha e de estocagem do leite, assim como o dimensionamento adequado desses últimos.

Broutin (2004) mostrou a eficiência de um método de contagem de bactérias feito pelo método BactoCount IB, por meio de uma técnica de citometria de fluxo rápida e sensível, desenvolvida para detectar bactérias individuais no leite cru, após a remoção de componentes capazes de causar interferência, rompendo a estrutura bacteriana e corando o DNA/RNA das bactérias por sonda fluorescente. Conclui que este método apresenta concordância com o método Oficial *Petrifilm* AOAC 986.33. Destacou a importância do uso deste método em relação ao Oficial, pelo baixo tempo para se ter resultado da análise e a alta capacidade de uso em larga escala.

Em 2002 foi aprovada a Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A IN nº 51 entrou em vigor em julho de 2005 e contém vários Regulamentos Técnicos. O Anexo IV (Regulamento Técnico de

Identidade e Qualidade de Leite cru refrigerado) estabelece que o leite cru poderá ter uma Contagem Padrão em Placas (CPP) máxima de 10^6 UFC/mL.

Nero et al. (2004) mostraram que 48,57% de amostras de leite cru coletadas nos Estados de Minas Gerais (Viçosa), Rio Grande do Sul (Pelotas), Paraná (Londrina) e São Paulo (Botucatu) estão em desacordo com a Instrução Normativa nº 51. Relataram que amostras sem refrigeração só foram encontradas na região de Londrina, sendo que das amostras que foram armazenadas sob refrigeração, 88,24% apresentavam contagem de mesófilos aeróbios abaixo de 10^6 UFC/mL, enquanto 56,52% das que não eram refrigeradas apresentavam contagens acima de 10^6 UFC/mL, estando em desacordo com a IN nº 51, e demonstrando assim, a importância da refrigeração para a manutenção da qualidade do leite cru. Mostraram ainda, que no Estado de São Paulo, as amostras eram armazenadas em refrigeração, mas transportadas de maneira não granelizada (permanecendo a temperatura ambiente durante o transporte), o que propiciou alta freqüência (68,00%) de amostras com contagens acima de 10^6 UFC/mL de mesófilos aeróbios. Nos Estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais o armazenamento era feito sob condição de refrigeração e o transporte a granel, sendo que 58,00% e 19,15% das amostras estavam fora do padrão estabelecido para a IN nº 51. A baixa freqüência de amostras fora do padrão da IN nº 51 em Viçosa - MG pode ser atribuída, provavelmente, a um programa de assistência técnica bem sucedido realizado com os produtores que tinham suas amostras analisadas. Descreveram que a adoção de refrigeração e transporte granelizado do leite cru podem contribuir para garantir a qualidade microbiológica do produto, porém, outras medidas com o desenvolvimento de programas regionais de assistência aos produtores leiteiros devem ser adotadas para que se consiga atender a bons padrões de qualidade microbiológica do leite cru.

Silva (2001) analisou 30 amostras de leite cru e em 3 casos (10%) atendiam a padrões para a classificação de tipo B e todas as outras 27 amostras (90%) atendiam os critérios para classificação como tipo C. Na época, a legislação em vigor não estabelecia parâmetro mínimo para a contagem de microrganismo aeróbios estritos e facultativos viáveis mesófilos para o leite tipo C. A IN Nº51/2002 (BRASIL, 2002), estabelece limite máximo para a CPP de mesófilos para o leite cru

em 10^6 UFC/mL, e analisando-se os dados da pesquisa, verifica-se que 20 amostras (66,66%) seriam desclassificadas.

Spexoto, Oliveira e Olival (2005) mostraram que através da implantação do sistema APPCC foi possível diminuir a severidade dos casos de mastite em um rebanho de vacas leiteiras (leite tipo A), porém não se observou efeito sobre a porcentagem de animais afetados pelo processo inflamatório da glândula mamária. Este sistema de controle do processo produtivo é capaz de diminuir a quantidade de coliformes totais e fecais em leite cru armazenado no tanque de refrigeração, mas isto não ocorre com as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos.

Souto et al. (2005a) analisaram o leite cru de 19 propriedades de leite do Estado de São Paulo e verificaram que 5 amostras apresentavam Contagem Padrão em Placas de microrganismos mesófilos acima de 10^6 UFC/mL, estando em desacordo com a IN Nº 51 (BRASIL, 2002). Destas cinco amostras, quatro eram de propriedades declaradas como produtoras de leite tipo B, com contagem máxima aceitável de 5 x 10^5 UFC/mL.

Souto et al. (2005b) descreveram que a tecnologia utilizada na ordenha não garante a boa qualidade microbiológica do leite cru, e que o monitoramento do procedimento de higienização é fundamental para se garantir um leite com baixo número de microrganismos.

Souto et al. (2005c) analisaram amostras de leite cru e encontraram Contagem de Bolores e Leveduras com mediana de 1,5 x 10^3 UFC/mL e média aritmética de 1,9 x 10^4 UFC/mL. Alertam que a presença de Bolores e Leveduras no leite cru pode proporcionar a permanência destes microrganismos em leite ou derivados lácteos após a pasteurização, prejudicando a qualidade do produto final e podendo comprometer a saúde do consumidor.

Souto et al. (2005d) realizaram Contagem de *Enterococcus* spp. em amostras de leite cru de propriedades rurais no Estado de São Paulo. As contagens variaram de 9,9 x 10^1 a 1,3 x 10^6 UFC/mL, com mediana de 1,8 x 10^4 UFC/mL e média aritmética de 1,9 x 10^5 UFC/mL. Mostraram que a Contagem de *Enterococcus* spp. em 2

propriedades de leite B das 10 estudadas e 1 de leite C das 9 estudadas, apresentaram contagem de *Enterococcus* spp. suficiente para desclassificar o produtos na plataforma de recebimento de leite, se se considerasse a Contagem Padrão em Placas estabelecida para a Instrução Normativa Nº 51 (BRASIL, 2002), destacando a importância do estudo da fonte de contaminação deste microrganismo na produção leiteira.

Panetta (1977) pesquisou amostras de leite pasteurizado tipo B e C, comercializados no verão de 1977 no município de São Paulo e verificou que houve uma grande variação da qualidade microbiológica, independente da marca pesquisada, fato considerado pelo pesquisador inadmissível para produtos controlados sob a mesma égide de um mesmo padrão e concorrentes, no mercado. Chamou a atenção ainda ao fato de amostras de leite tipo B apresentarem discordância com o padrão microbiológico regulamentar da época (BRASIL, 1952).

Barros (2004) analisou 65 amostras de leite UHT (Ultra High Tempertature) de indústrias processadoras do Estado de São Paulo, sob jurisdição do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e verificou que 7 amostras (10,76%) apresentaram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos acima dos padrões para produção de leite UHT no Brasil (BRASIL, 1997). Descreveu ainda a importância do gênero *Bacillus* sp como contaminante de leite UHT.

Meireles (2000) alertou para o problema da venda de leite clandestino no Brasil, descrevendo o potencial risco do produto sem tratamento térmico à saúde do consumidor. Mostrou que em pesquisa feita no mês de fevereiro do ano de 2000 pela Rio-Estudos & Projetos, 73% das pessoas que compravam leite clandestino tinham baixa escolaridade, sendo que 94% pertenciam a classes de baixa renda familiar (C, D e E). Constatou ainda que apenas 5% dos entrevistados conseguiram associar a ingestão de leite cru à ocorrência de algum problema de saúde.

2.4 UTILIZAÇÃO DE PCR PARA A DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Phuektes et al. (2003) destacaram a técnica de PCR como um método rápido para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* em leite de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras.

Salasia et al. (2004) estudaram características fenotípicas e genotípicas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina na Indonésia e Alemanha pela técnica de PCR. Observaram que *Staphylococcus aureus* isolados nos dois países apresentaram pequenas diferenças em sua constituição genotípica, indicando que as características de virulência parecem ser tão importantes para os casos de mastite bovina na Indonésia, quanto na Alemanha.

3 OBJETIVOS

- Pesquisar os índices de mastite e os agentes infecciosos envolvidos no processo inflamatório da glândula mamária em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de São Paulo.

- Analisar a qualidade do leite cru de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo.

- Averiguar as correlações existentes entre os indicadores dos índices de mastite em rebanhos leiteiros bovinos.

- Verificar se existe correlação entre o índice de mastite em rebanhos leiteiros bovinos e a qualidade microbiológica do leite cru.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais e as metodologias utilizadas para a realização deste experimento.

4.1 ESCOLHA DAS PROPRIEDADES

Trinta e seis propriedades rurais, com atividade exploratória leiteira de bovinos, do Estado de São Paulo, Brasil, foram selecionadas por conveniência por técnicos autônomo, de empresa ou cooperativa atuante no setor, situadas nas regiões onde se coletou as amostras. O período de coleta foi de abril de 2004 a setembro de 2005. O número e a localização das propriedades onde se obteve as amostras estão no quadro 1.

Cidade	Número de amostras
Analândia	1
Araras	1
Caçapava	1
Casa Branca	1
Descalvado	1
Holambra	3
Jacareí	3
Jambeiro	1
Leme	2
Piracicaba	2
Pirassununga	1
Santa Cruz da Conceição	1
São José dos Campos	5
São Pedro	13
TOTAL	**36**

Quadro 1 - Cidades que fizeram parte do Experimento e número de propriedades visitadas

4.2 MASTITE

Para a investigação do índice de mastite foram desprezados os 2 primeiros jatos de leite, feito teste de Tamis (caneca de fundo escuro), conforme Blood e Radostits (1991) e CMT (*Califórnia Mastitis Test*), conforme Schalm e Noorlander (1957) de todos os quartos mamários em produção. Para os quartos que apresentaram resultado positivo para teste de Tamis e/ou CMT foi coletada uma amostra de leite (aproximadamente 5,0 mL) em tubo estéril (100 x 13 mm) tampado com rolha de silicone e encaminhado sob condições de refrigeração (aproximadamente 7º ± 1ºC) em caixa isotérmica com gelo biológico, para o Laboratório de Doenças Infecciosas (Bactérias e Fundos) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, para isolamento microbiológico.

No laboratório as amostras foram congeladas em Aparelho Congelador (Cônsul, Cód. CRC24D)[1] (-12º ± 1ºC) até o momento do exame, sendo respeitado um período máximo de trinta dias. As amostras foram então, descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas em Aparelho Agitador Vortex para Tubos (Quimis, Cód. Q, 220A)[2] e semeadas com alça de platina (0,01 mL) em Agar Sangue - *Blood Agar Base* (Oxoid, Cód. CM 0055)[3] com adição de sangue de carneiro 5%, previamente incubados por um período 18 horas (*over night*) para se verificar condições de esterilidade do meio de cultura. As placas foram incubadas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 ± 1ºC. Foram feitas leituras em 24, 48 e 72 horas para se verificar a presença de microrganismos (Figura 1). As amostras que não apresentavam crescimento (negativas) de pelo menos um microrganismo, eram re-analisadas.

Os microrganismos isolados (bactérias e fungos) foram identificados de acordo com Kreeger-van-Rij (1984), Lennete et al. (1985) e Lodder (1970) e classificados segundo Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

---

1 Consul, Multibrás S. A. Eletrodomésticos, São Paulo, SP, Brasil.

2 Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil.

3 Oxoid Ltd., Bsingstone, Hants., England.

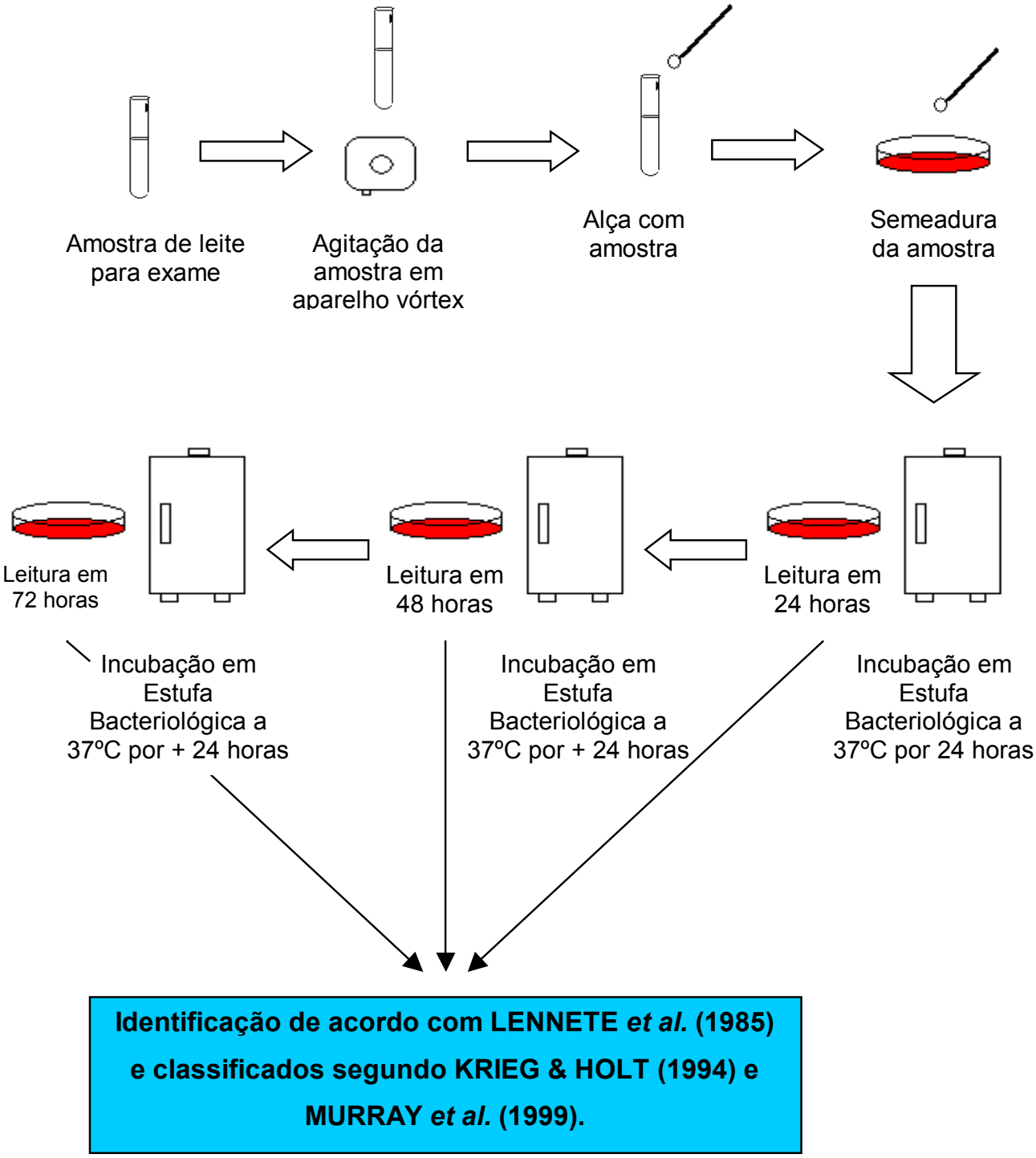

Figura 1 – Representação esquemática da metodologia utilizada para o isolamento de microrganismos dos casos de mastite

4.3 LEITE CRU

Para a análise da qualidade do leite cru, a metodologia utilizada está descrita abaixo.

4.3.1 Coleta e armazenamento do leite cru

A amostras de leite cru foram coletadas de tanques de refrigeração ou de latões para armazenamento (uma alíquota de cada latão da ordenha examinada para mastite, compunha uma amostra), de acordo com o sistema produtivo de cada propriedade. Com uma caneca estéril, homogeneizava-se o leite dos latões ou no caso dos tanques de refrigeração a homogeneização era feita pelo próprio equipamento. Com a caneca estéril, uma amostra de aproximadamente 200 mL foi coletada e transferida para uma garrafa de vidro estéril utilizando-se um funil, também esterilizado. A amostra de leite cru foi então, encaminhada sob condições de refrigeração (7º $\pm$ 1ºC) em caixa isotérmica com gelo biológico, para o Laboratório de Doenças Infecciosas (Bactérias e Fundos) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

No Laboratório as amostras foram armazenadas sob refrigeração (7º $\pm$ 1ºC) por um período máximo de 18 horas, sendo então, submetidas à análise microbiológica para se verificar a quantidade de microrganismos no leite cru.

4.3.2 Análise microbiológica do leite cru

O texto a seguir refere-se a técnica utilizada para a quantificação de microrganismos no leite cru.

4.3.2.1 Diluição das amostras

Após a homogeneização da amostra, foram realizadas as diluições decimais seriadas, até 10^{-6} (sexta potência), em água peptonada 0,1% - Peptona Bacteriológica 0,1% (Difco, Cód. 0118-17)[4], e utilizada para a semeadura nos meios específicos (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001).

4.3.2.2 Técnicas de contagem e estimativa de microrganismos no leite cru

Abaixo estão descritas as técnicas utilizadas para se obter o número ou estimativa de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) ou Número Mais Provável de microrganismos por mililitro (NMP/mL) no leite cru.

4.3.2.2.1 Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (Contagem Padrão em Placas – CPP)

As suspensões diluídas até 10^{-6}, foram semeadas em profundidade, em duplicata, em Agar para Contagem Padrão em Placas - *Plate Count Agar Standard Methods Agar* (Difco, Cód. 0479-17), acrescido de TTC a 1% (Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio) (Vetec, Cód. 875)[5], na proporção de 1 mL/ 100 mL de meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 $\pm$ 1ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Todas as colônias observadas foram consideradas para a contagem, independente de sua coloração, forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 25 e 250 colônias (Figura 2).

---

4 Difco, Becton Dickinson, Sparks, USA.

5 Vetec Química Fina Ltda., Taboão da Serra, SP, Brasil.

4.3.2.2.2 Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios estritos e facultativos viáveis

As amostras diluídas até 10^{-5}, foram semeadas em superfície, em duplicata, em Agar para Contagem Padrão em Placas - *Plate Count Agar Standard Methods Agar* (Difco, Cód. 0479-17), acrescido de TTC a 1% (Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio) (Vetec, Cód. 875), na proporção de 1 mL/ 100 mL de meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 12 $\pm$ 2ºC por 7 dias (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Todas as colônias observadas foram consideradas para a contagem, independente de sua coloração, forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 25 e 250 colônias (Figura 3).

4.3.2.2.3 Contagem de microrganismos termófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

O leite diluído até 10^{-3}, foi semeado em profundidade, em duplicata, em Agar para Contagem Padrão em Placas - *Plate Count Agar Standard Methods Agar* (Difco, Cód. 0479-17), acrescido de TTC a 1% (Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio) (Vetec, Cód. 875), na proporção de 1 mL/ 100 mL de meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 52 $\pm$ 2ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Todas as colônias observadas foram consideradas para a contagem, independente de sua coloração, forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 25 e 250 colônias (Figura 2).

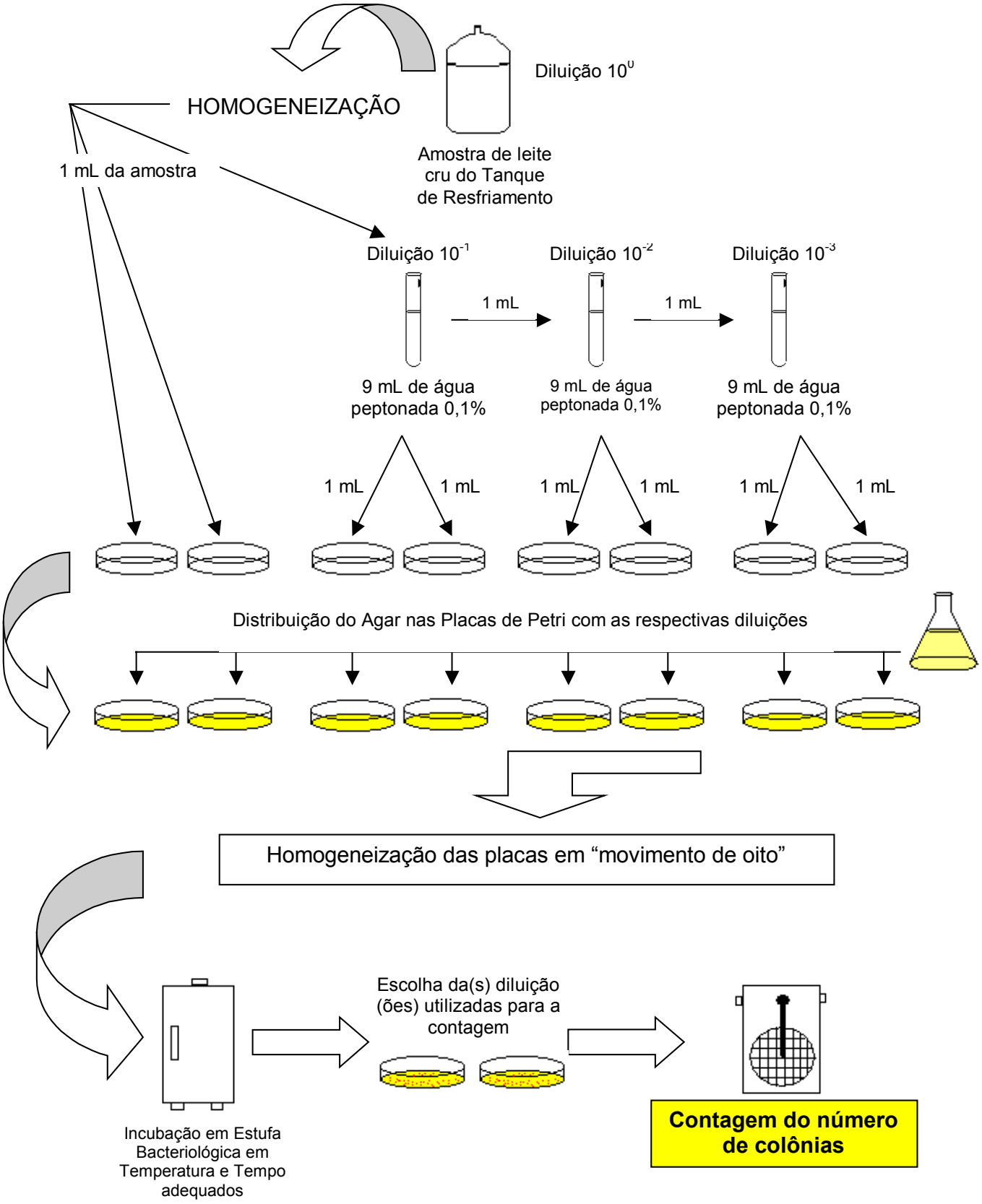

Figura 2 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem de microrganismos em profundidade

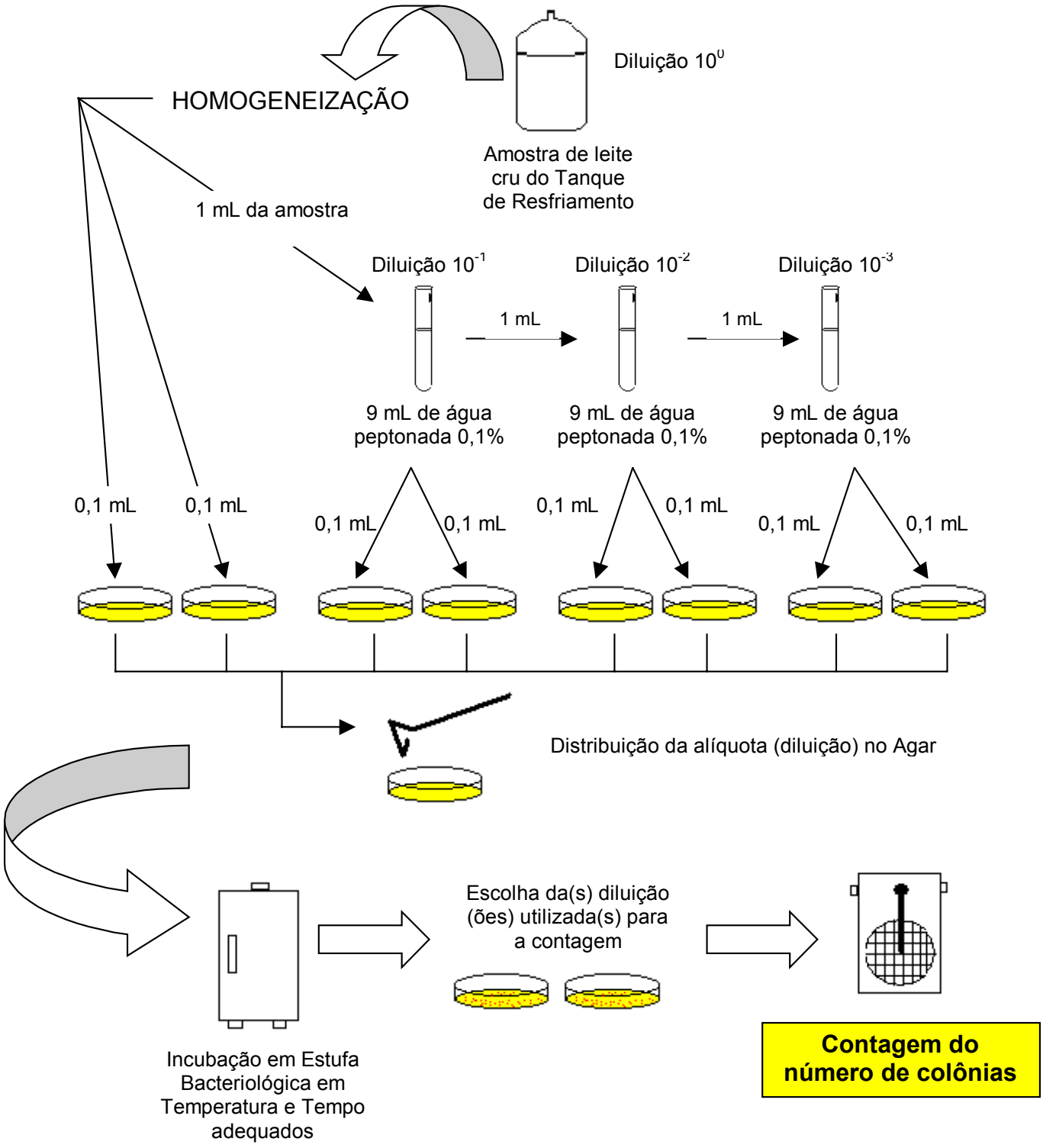

Figura 3 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem de microrganismos em superfície

4.3.2.2.4 Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

A técnica utilizada para se determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais foi feita de acordo com APHA (2001), conforme indicado na figura 4. Após homogeneização e diluição da amostra até 10^{-5}, repassava-se 1 mL de cada diluição, em triplicata, para tubos com um tubo de Durhan invertido cada, contendo Caldo Bile Verde Brilhante - *Brila Broth* (Merck, Cód. 1.05454.0500)[6]. Os tubos foram incubados em Banho-Maria com agitação (Quimis, Cód. Q-215-1) a 36 ± 1ºC por 42-48 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo positivo (turvação do meio e produção de gás em tubo de Duhran invertido) foi semeada em uma placa de Ágar MacConckey - *MacConckey Agar* (Difco, Cód. 0075-17) para confirmação de crescimento de microrganismo. As placas foram incubadas invertidas a 37 ± 1ºC por 18-24 horas. Os tubos que apresentavam turvação do meio, produção de gás em tubo de Durhan invertido e crescimento de colônia após repique em Agar MacConckey foram considerados positivos.

4.3.2.2.5 Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais

A técnica utilizada para se determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais foi feita de acordo com APHA (2001), conforme indicado na figura 5. Cada tubo positivo na técnica de NMP de coliformes totais (turvação do meio e produção de gás em tubo de Durhan invertido), foi semeado em um tubo com Caldo EC - *EC Broth* (Difco, Cód. 0314-17) e um com Caldo Triptona - *Bacto Tryptone* (Difco, Cód. 0123-01). Os tubos com Caldo EC continham um tudo de Duhran invertido cada e foram incubados a 44,5 ± 1ºC por 42-48 horas. Os tubos que apresentavam no Caldo EC turvação do meio e produção de gás em tubo de Durhan invertido, e prova do Indol positiva no tubo com Caldo Triptona, foram considerados positivos.

[6] Merck KgaA, Darmstadt, Germany.

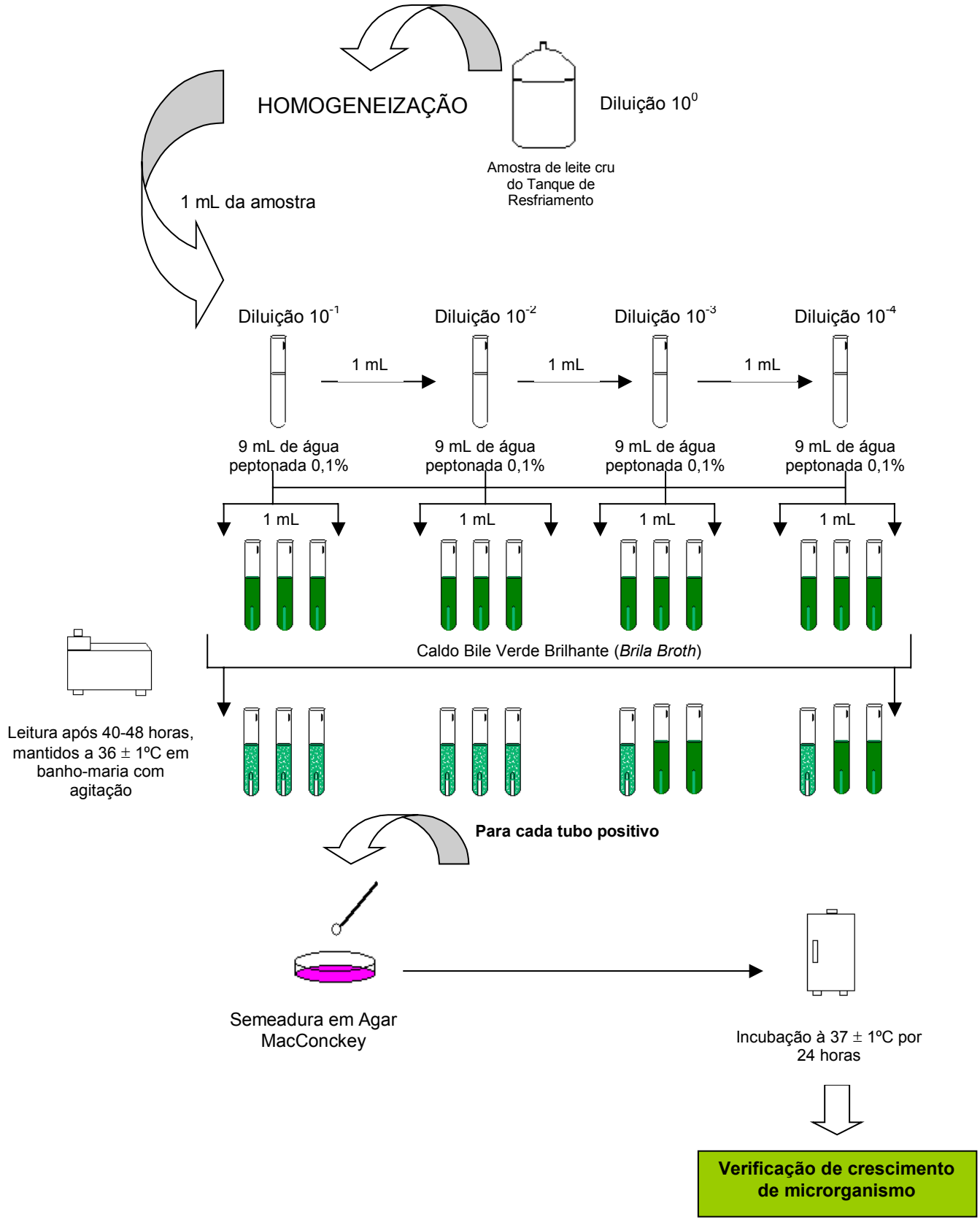

Figura 4 – Representação esquemática da técnica de Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

4.3.2.2.6 Contagem de Stapylococcus spp.

As suspensões diluídas até 10^{-5}, foram semeadas em superfície, em duplicata, em Agar Baird-Parker - *Baird-Parker Agar* (Merck, Cód. 1.05406.0500), acrescido de 50 mL de uma solução de *Egg Yolk* com Telurito de Potássio (Laborclin, Cód. 520089)[7] para cada 1000 mL do meio de cultura. As placas foram incubadas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 ± 1ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Foram consideradas, para contagem todas as colônias de coloração negra ou cinza, independente da forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 10 e 150 colônias (Figura 3).Todas as colônias contadas foram consideradas representativas do gênero *Staphylococcus* spp.

4.3.2.2.7 Contagem de Enterococcus spp.

As amostras dilulídas até 10^{-5}, foram semeadas em profundidade, em duplicata, em *KF Streptococcus Agar* (Difco, Cód. 0496-17), acrescido de TTC a 1% (Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio) (Vetec, Cód. 875), na proporção de 1 mL/ 100 mL de meio de cultura. As placas foram incubadas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 ± 1ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Foram consideradas, para contagem todas as colônias de coloração avermelhada, independente da forma ou tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 25 e 250 colônias (Figura M2). Todas as colônias contadas foram consideradas representativas do gênero *Enterococcus* spp.

[7] Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., Pinhais, PR, Brasil.

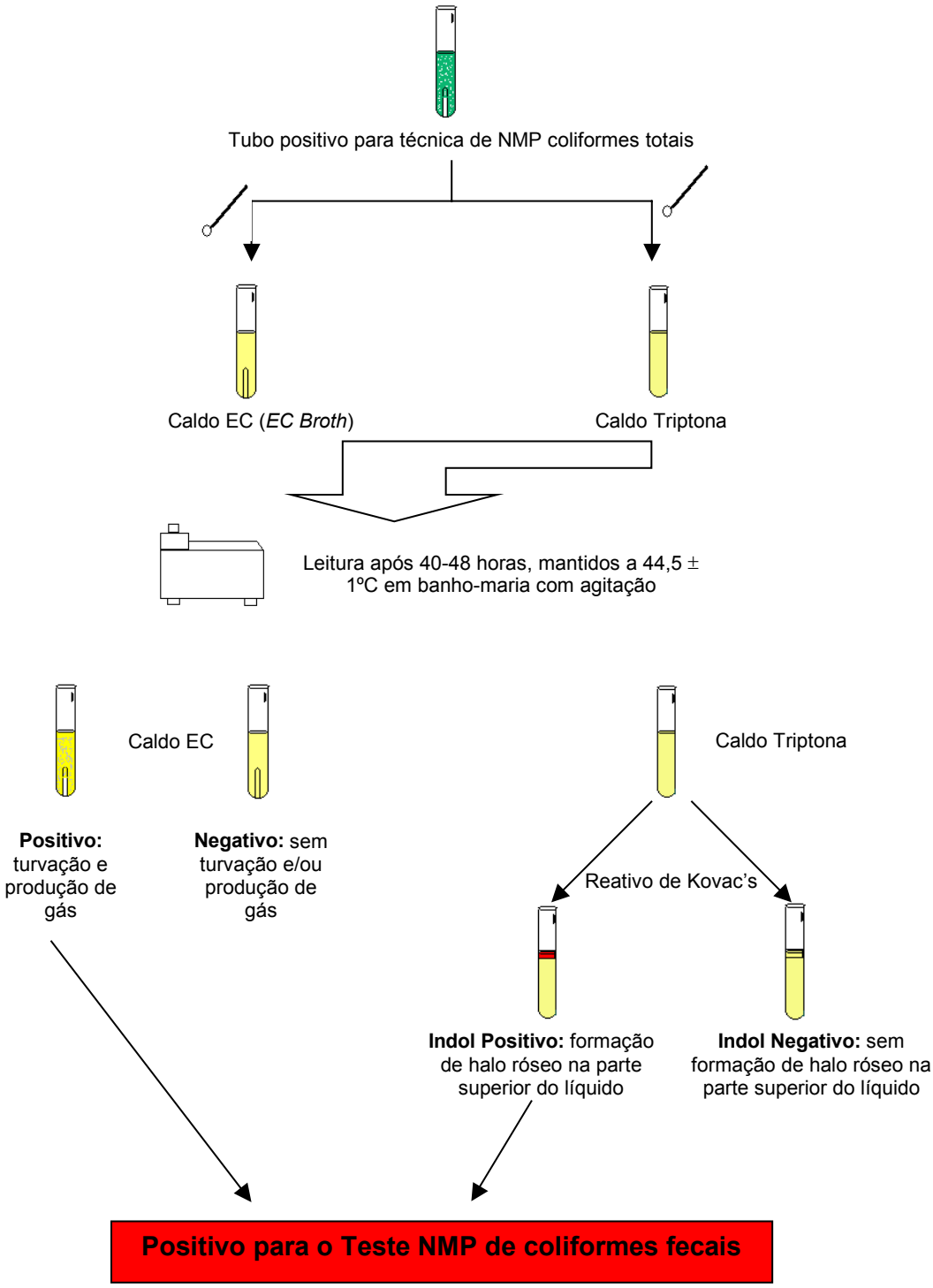

Figura 5 – Representação esquemática da técnica de Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais

4.3.2.2.8 Contagem de Streptococcus spp.

O leite diluído até 10^{-5}, foi semeado em superfície, em duplicata, em *Edwards Medium (Modified)* (Oxoid, Cód. CM0027), acrescido de 5% de sangue de carneiro defibrinado, descrito por EDWARDS (1933) e McKENZIE (1941). As placas foram incubadas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 ± 1ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Foram consideradas, para contagem todas as colônias independente da coloração, forma, tamanho ou presença de hemólise. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 10 e 50 colônias (Figura 3). Todas as colônias contadas foram consideradas representativas do gênero *Streptococcus* spp.

4.3.2.2.9 Contagem de Corynebacterium spp.

As suspensões diluídas até 10^{-5}, foram semeadas em superfície, em duplicata, em *Blood Agar Base* (Oxoid, Cód. CM 0055), acrescido de 5% de sangue de carneiro defibrinado e solução de Telurito de Potássio a 3,5% (Inlab, Cód. 7260)[8] na proporção de 1mL para cada 100 mL de meio de cultura, segundo (HARRIGAN, 1998; STOKES; RIDGWAY; WREN, 1993). As placas foram incubadas em Estufa Bacteriológica (Quimis, Cód. Q-316M5) a 37 ± 1ºC por 42-48 horas (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Foram consideradas, para contagem todas as colônias de coloração negra ou cinza, independente da forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 10 e 150 colônias (Figura 3). Todas as colônias contadas foram consideradas representativas do gênero *Corynebacterium* spp.

[8] Inlab, Alamar Tecno Científica Ltda., Diadema, SP, Brasil.

4.3.2.2.10 Contagem de bolores e leveduras

Após a homogeneização e diluição até 10^{-5}, as amostras foram semeadas em profundidade, em duplicata, em Agar Dextrose Batata - *Potato Dextrose Agar* (Merck, Cód. 1.10130.500), acrescido de uma solução de Ácido L(+) Tartárico a 10% (Synth, Cód. A1063.01.AF) numa proporção de 14 mL para cada 1000 mL de meio, e adicionado uma solução de TTC a 1% (Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazolio) (Vetec, Cód. 875), na proporção de 1 mL/ 100 mL de meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas em temperatura ambiente por 5 dias (APHA, 2001; U.S. FDA, 2001). Todas as colônias observadas eram consideradas para a contagem, independente de sua coloração, forma e tamanho. Para contagem selecionou-se as placas que tinham entre 25 e 250 colônias (Figura 2). Todas as colônias contadas foram consideradas representativas para bolores e leveduras.

4.3.2.3 Sensibilidade dos testes de quantificação de microrganismos no leite cru

A técnica de plaqueamento em profundidade (Figura 2), detectada a partir de uma colônia por mililitro. Para os resultados negativos (sem crescimento de nenhuma colônia na menor diluição testada), ou seja, menor que uma colônia por mililitro, adotou-se o critério de se atribuir o valor zero para realizar as análises estatísticas.

A técnica de plaqueamento em superfície (Figura 3), detectada a partir de dez colônias por mililitro. Para os resultados negativos (sem crescimento de nenhuma colônia na menor diluição testada), ou seja, menor que dez colônias por mililitro, adotou-se o critério de se atribuir o valor zero para se realizar as análises estatísticas.

Na técnica de Número Mais Provável (NMP) (Figuras 4 e 5), são determinados os NMP/mL entre 0,3 e 110000, nas condições de teste realizados. Para aqueles resultados sem algum resultado positivo, ou seja, valor menor que 0,3 e para aqueles com valor maior que 110000, foram atribuídos os valores de zero e 110000, respectivamente para a realização das análises estatísticas.

4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos das medianas, Teste de Correlação de Pearson e Regressão Linear foram feitos de acordo com Gomes, (1978); Spinelli e Souza (1990); Sounis (1975). Fez-se também o cálculo da transformação do logaritmo das contagens de microrganismos no leite cru.

Para o cálculo da transformação do logaritmo das contagens de microrganismos no leite cru e medianas utilizou-se o software OpenOffice 2.0 Calc (2005).

Para estudar a Correlação e Regressão Linear dos índices de mastite entre si, e a transformação do logaritmo das contagens de microrganismos no leite cru com os índices de mastite, usou-se o software Minitab Realise14.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos na pesquisa estão descritos abaixo.

5.1 MASTITE

Foram coletadas amostras de 1180 (100%) dos animas em lactação de 36 propriedades produtoras de leite participantes do estudo. Analisou-se 4662 (98,77%) quartos mamários, sendo que 58 (1,24%) estavam perdidos. Cento e vinte e cinco (2,68%) quartos mamários apresentaram resultado positivo ao teste da caneca de fundo escuro, indicativo de mastite clínica. Um mil oitocentos e vinte e quatro (39,12%) quartos mamários foram positivos ao teste CMT, indicando o número total de casos de mastite. Considerando-se a diferença obtida entre os resultados positivos ao teste de CMT (1824) e teste da caneca de fundo escuro (125), temos o valor de um mil seiscentos e noventa e nove (36,44%) de glândulas mamárias com processo inflamatório subclínico (Tabela 1).

Dos 1824 casos de mastite detectados no teste CMT, 379 (8,13%) não apresentaram crescimento de microrganismo, indicando o número de casos de mastite não infecciosa, e 1445 (31,00%) apresentaram crescimento de pelo menos um gênero de microrganismo, indicando o número de casos de mastite infecciosa(Tabela 1).

Dos 1445 casos de mastite infecciosa, em 429 (9,20%) isolou-se *Staphylococcus* spp.; 249 (5,34%) *Streptococcus* spp.; 524 (11,24%) *Corynebacterium* spp.; 58 (1,24%) *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; 94 (2,02%) *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.; 7 (0,15%) *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.; 2 (0,04%) *Staphylococcus* spp. e alguma outra espécie de microrganismo que não *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.; 4 (0,09%) *Streptococcus* spp. e alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.; 1 (0,02%) *Corynebacterium* spp. e

alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; e 14 (0,30%) alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ou *Corynebacterium* spp. (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados dos totais de análises dos exames de mastite e suas porcentagens médias, no período de agosto de 2003 a setembro de 2005, no Estado de São Paulo

Item analisado	Total	Porcentagem Média
Animais em ordenha	1180	100,00
Quartos mamários perdidos	58	1,23
Quartos mamários analisados	4662	98,77
Teste Positivo para Caneca de fundo escuro	125	2,68
Teste CMT positivo	1824	39,12
Mastite não infecciosa	379	8,13
Mastite infecciosa	1445	31,00
Staphylococcus sp.	429	9,20
Strepotococcus sp.	249	5,34
Corynebacterium sp.	524	11,24
Staphylococcus sp. + Streptotococcus sp.	58	1,24
Staphylococcus sp. + Corynebacterium sp.	94	2,02
Streptococcus sp. + Corynebacterium sp.	63	1,35
Staphylophylococcus sp. + Streptococcus sp. + Corynebacterium sp.	7	0,15
Outros microrganismos isolados + Staphylococcus sp.	2	0,04
Outros microrganismos isolados + Streptococcus sp.	4	0,09
Outros microrganismos isolados + Corynebacterium sp.	1	0,02
Outros microrganismos isolados	14	0,30

Os dados com número de caso(s) mínimo e máximo encontrado(s) em pelo menos uma das propriedades estudadas, a média aritmética e mediana de todas as propriedades estudadas podem ser observados na tabela 2**,** salientando-se que a mediana do número de animais em ordenha por propriedade foi 27 (9-92), número de quartos mamários em produção por propriedade analisada foi 107,5 (36-364), resultado positivo para o teste da caneca de fundo escuro por propriedade foi 1 (0-19), resultado positivo para o teste CMT por propriedade foi 46 (7-148), número de quartos mamários com mastite não infecciosa por propriedade foi 6 (0-42), número de quartos mamários com mastite infecciosa por propriedade foi 34,5 (6-126), número de quartos mamários com mastite por *Staphylococcus* spp. por propriedade foi 9 (1-37), número de quartos mamários com mastite por *Streptococcus* spp. por propriedade foi 5 (0-34), número de quartos mamários com mastite por *Corynebacterium* spp. por propriedade 9 (0-64), número de quartos mamários com

mastite por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. por propriedade foi 1 (0-12), número de quartos mamários com mastite por *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 2 (0-12), número de quartos mamários com mastite por *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 1 (0-8), número de quartos mamários com mastite por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 0 (0-2), número de quartos mamários com mastite por *Staphylococcus* spp. e número de quartos mamários com mastite por *Staphylococcus* spp. e alguma outra espécie de microrganismo que não *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 0 (0-2), número de quartos mamários com mastite por *Streptococcus* spp. e alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 0 (0-1), número de quartos mamários com mastite por *Corynebacterium* spp. e alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. por propriedade foi 0 (0-1), e número de quartos mamários com mastite por alguma outra espécie de microrganismo que não *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ou *Corynebacterium* spp. por propriedade foi 0 (0-5).

5.2 LEITE CRU

Das amostra de leite cru coletadas de cada propriedade visitada, foram realizadas as análises quantitativas descritas no item 4.3.2, em Materiais e Métodos, em todas as amostras de leite cru.

O menor e maior valor da(s) Contagem(ns) encontrado(s) em pelo menos uma das amostras, a média aritmética e mediana das Contagens das amostras de leite cru estão apresentadas na tabela 3, salientando-se que a mediana da Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis foi 2,19 x 10^5 UFC/mL (1,54 x 10^3 – 1,41 x 10^8), Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios facultativos viáveis foi 4,05 x 10^5 UFC/mL (2,20 x 10^2 – 1,38 x 10^8), Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis foi 2,52 x 10^0 UFC/mL (< 1,00 x 10^0 – 9,50 x 10^1), Contagem de *Enterococcus* spp. foi 4,05 x 10^4 UFC/mL

(2,60 x 10^1 – 2,32 x 10^7), Contagem de *Staphylococcus* spp. foi 2,83 x 10^4 UFC/mL (1,36 x 10^3 – 2,00 x 10^7), Contagem de *Streptococcus* spp. foi 4,20 x 10^4 UFC/mL (2,50 x 10^1 – 2,85 x 10^7), Contagem de *Corynebacterium* spp. foi 1,44 x 10^4 UFC/mL (1,35 x 10^2 – 1,73 x 10^7), Contagem de Bolores e Leveduras foi 2,69 x 10^3 UFC/mL (3,00 x 10^3 – 1,59 x 10^5), Número Mais Provável de coliformes totais foi 2,25 x 10^3 NMP/mL (9,30 x 10^0 – 1,10 x 10^5), Número Mais Provável de coliformes fecais foi 1,50 x 10^0 NMP/mL (< 3,00 x 10^{-1} – 1,50 x 10^0).

Tabela 2 – Número mínimo, máximo e mediana dos resultados das análises de mastite, no período de agosto de 2003 a setembro de 2005, no Estado de São Paulo

Item analisado	Mínimo[1]	Máximo[2]	Mediana[3]
Animais em ordenha	9	92	27
Quartos mamários analisados	36	364	107,5
Teste Positivo para Caneca de fundo escuro	0	19	1
Teste CMT positivo	7	148	46
Mastite não infecciosa	0	42	6
Mastite infecciosa	6	126	34,5
Staphylococcus sp.	1	37	9
Strepotococcus sp.	0	34	5
Corynebacterium sp.	0	64	9
Staphylococcus sp. + Streptotococcus sp.	0	12	1
Staphylococcus sp. + Corynebacterium sp.	0	12	2
Streptococcus sp. + Corynebacterium sp.	0	8	1
Staphylophylococcus sp. + Streptococcus sp. + Corynebacterium sp.	0	2	0
Outros microrganismos isolados + Staphylococcus sp.	0	2	0
Outros microrganismos isolados + Streptococcus sp.	0	1	0
Outros microrganismos isolados + Corynebacterium sp.	0	1	0
Outros microrganismos isolados	0	5	0

[1] Indica número de caso(s) mínimo encontrado(s) em pelo menos uma das propriedades

[2] Indica número de caso(s) máximo encontrado(s) em pelo menos uma das propriedades

[3] Indica a Mediana de todas as propriedades estudadas

Tabela 3 – Número mínimo, máximo e mediana dos resultados das análises de leite cru, no período de agosto de 2004 a setembro de 2005, no Estado de São Paulo

Técnica de Contagem	Mínimo[1]	Máximo[2]	Mediana[3]
CPP Mesófilos	1,54E+03	1,41E+08	2,19E+05
CPP Psicrotróficos	2,20E+02	1,38E+08	4,05E+05
CPP Termófilos	0,00E+00	9,50E+01	5,25E+00
Enterococcus spp.	2,60E+01	2,32E+07	4,05E+04
Staphylococcus spp.	1,36E+03	2,00E+07	2,83E+04
Streptococcus spp.	2,50E+01	2,85E+07	4,20E+04
Micrococcus spp.	1,35E+02	1,73E+07	1,44E+04
Bolores e Leveduras	3,00E+00	1,59E+05	2,69E+03
NMP coliformes totais	9,30E+00	1,10E+05	2,25E+03
NMP coliformes fecais	0,00E+00	9,30E+03	1,50E+00

[1] Indica menor valor da Contagem(ns) encontrado(s) em pelo menos uma das amostras de leite cru (em UFC/mL)
[2] Indica maior valor da Contagem(ns) encontrado(s) em pelo menos uma das amostras de leite cru (em UFC/mL)
[3] Indica o valor da Mediana de todas as as Contagens das amostras de leite cru (em UFC/mL)

5.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DE MASTITE

A tabela 4 mostra o resultado da análise de correlação entre os índices de mastite dos rebanhos leiteiros estudados, ressaltando-se que se verificou correlação entre os índices de resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e CMT (Figura 6), resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e casos de mastite infecciosa (Figura 7), resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e casos de mastite com isolamento de *Corynebacterium* spp. (Figura 8), resultados positivos ao teste CMT e casos de mastite de causa não infecciosa (Figura 9), resultados positivos ao teste CMT e de mastite infecciosa (Figura 10), resultados positivos ao teste CMT e casos de mastite com isolamento de *Staphylococcus* spp. (Figura 11), resultados positivos ao teste CMT e casos de mastite com isolamento de *Streptococcus* spp. (Figura 12), resultados positivos ao teste CMT e casos de mastite com isolamento de *Corynebacterium* spp. (Figura 13), casos de mastite infecciosa e casos de mastite com isolamento de *Staphylococcus* spp. (Figura 14), casos de mastite infecciosa e casos de mastite com isolamento de

Streptococcus spp. (Figura 15), casos de mastite infecciosa e casos de mastite com isolamento de *Corynebacterium* spp. (Figura 16).

A melhor correlação foi entre o índice de resultados positivos ao teste CMT e os casos de mastite de causa infecciosa (r = 0,920 e R^2 = 84,7%) (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4 – Resultado das análises de Correlação de Pearson e Coeficiente de Determinação da Reta dos casos de mastite estudados, no período de agosto de 2004 a setembro de 2005, no Estado de São Paulo

Análises	**r*****	**R^2 (%)******
Teste da Caneca de Fundo Escuro X CMT	0,473**	19,1
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Mastite não Infecciosa	0,272	7,4
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Mastite Infecciosa	0,358*	12,8
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Mastite por *Staphylococcus* spp.	-0,055	0,3
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Mastite por *Streptococcus* spp.	0,145	2,1
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Mastite por *Corynebacterium* spp.	0,519**	27,0
CMT X Mastite não Infecciosa	0,383*	14,6
CMT X Mastite Infecciosa	0,920**	84,7
CMT X Mastite por *Staphylococcus* spp.	0,551**	30,4
CMT X Mastite por *Streptococcus* spp.	0,420*	17,6
CMT X Mastite por *Corynebacterium* spp.	0,562**	31,6
Mastite não Infecciosa X Mastite Infecciosa	-0,009	0,0
Mastite não Infecciosa X Mastite por *Staphylococcus* spp.	-0,205	4,2
Mastite não Infecciosa X Mastite por *Streptococcus* spp.	0,127	1,6
Mastite não Infecciosa X Mastite por *Corynebacterium* spp.	0,074	0,5
Mastite Infecciosa X Mastite por *Staphylococcus* spp.	0,684**	46,7
Mastite Infecciosa X Mastite por *Streptococcus* spp.	0,401*	16,1
Mastite Infecciosa X Mastite por *Corynebacterium* spp.	0,577*	33,3
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Mastite por *Streptococcus* spp.	-0,059	0,3
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Mastite por *Corynebacterium* spp.	-0,058	0,3
Mastite por Streptococcus spp. X Mastite por *Corynebacterium* spp.	0,007	0,0

* indica significância estatística (p<0,05)

** indica alta significância estatística (p<0,01)

*** Coeficiente de Correlação de Pearson

**** Coeficiente de Determinação da Reta

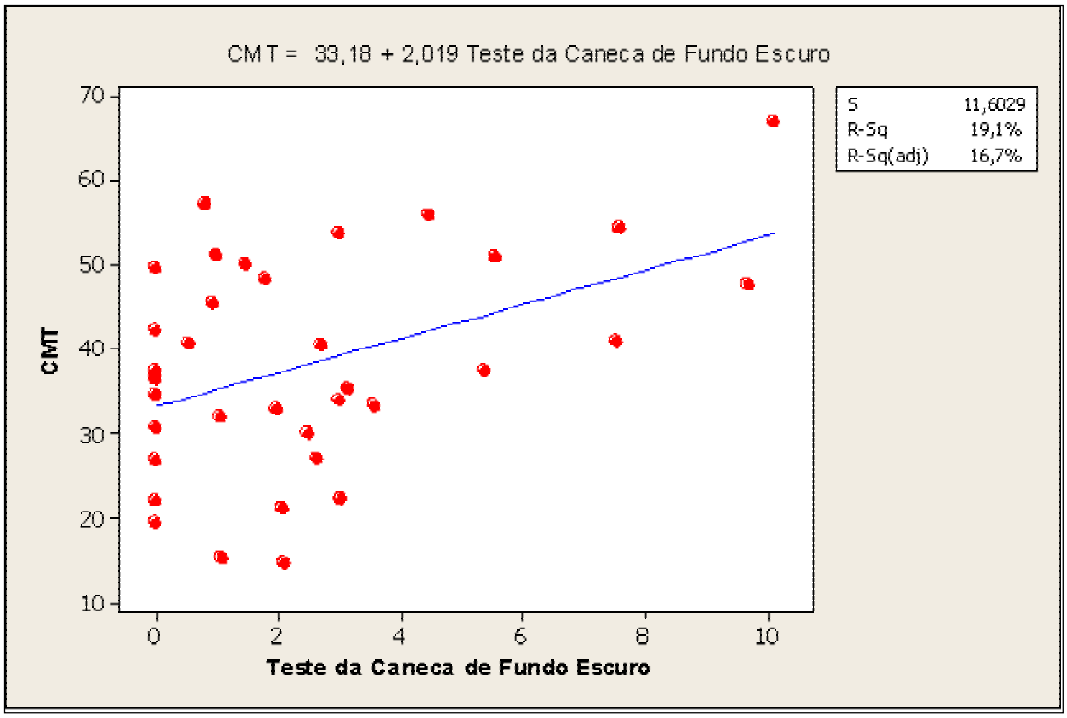

Figura 6 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e CMT

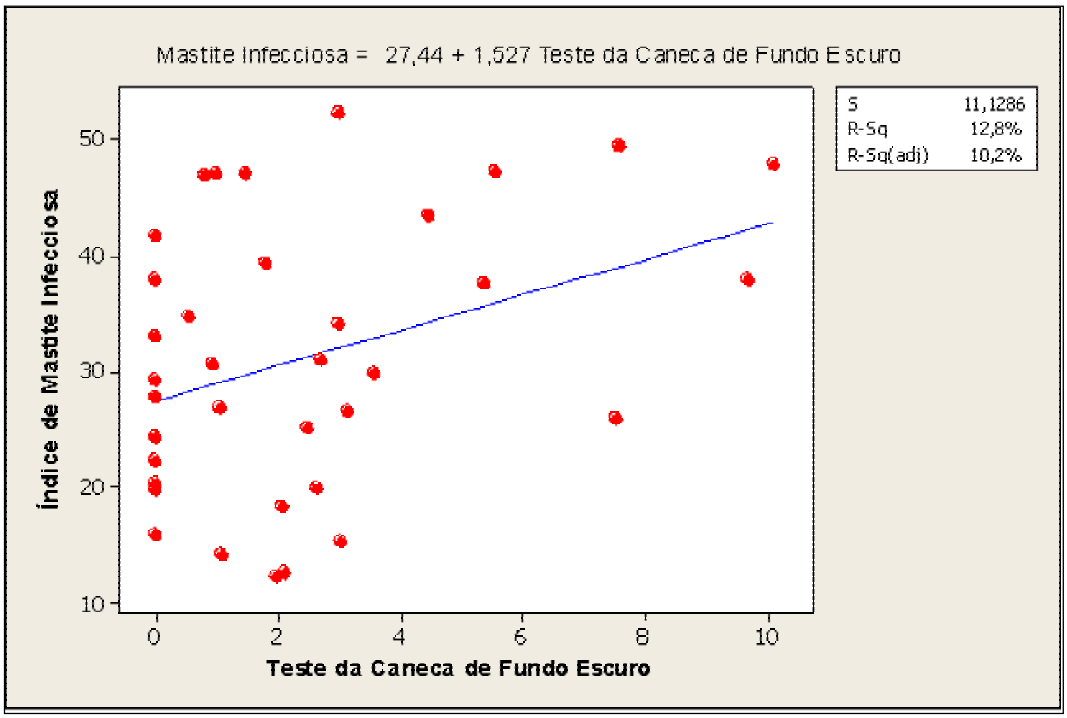

Figura 7 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite infecciosa

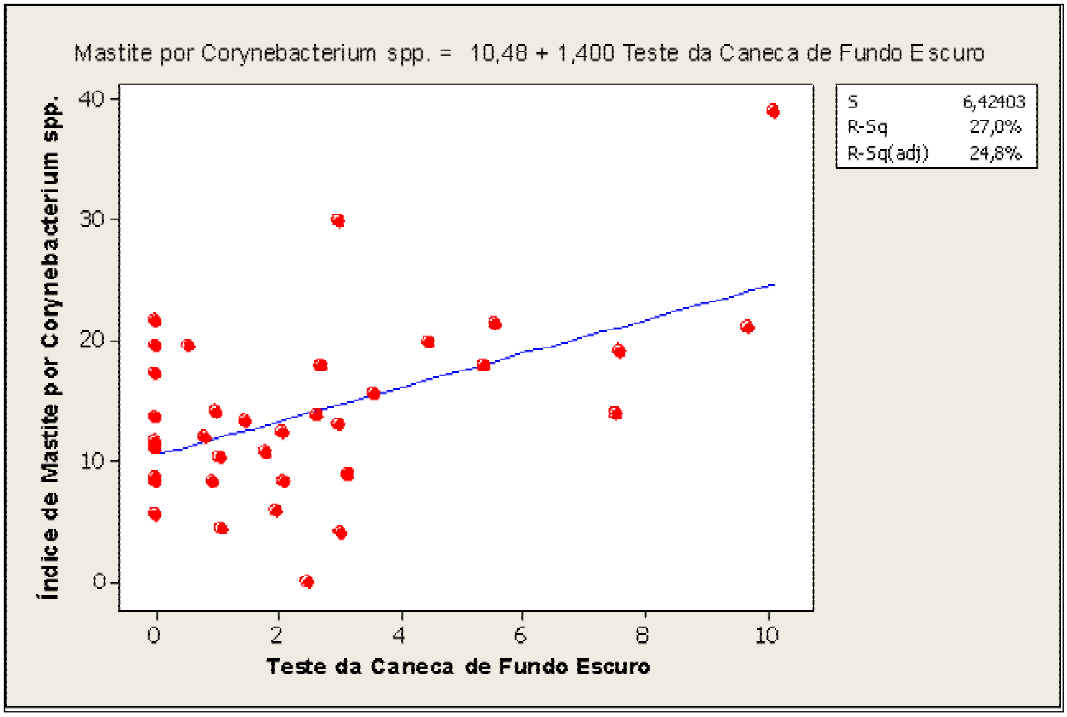

Figura 8 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite por *Corynebacterium* spp.

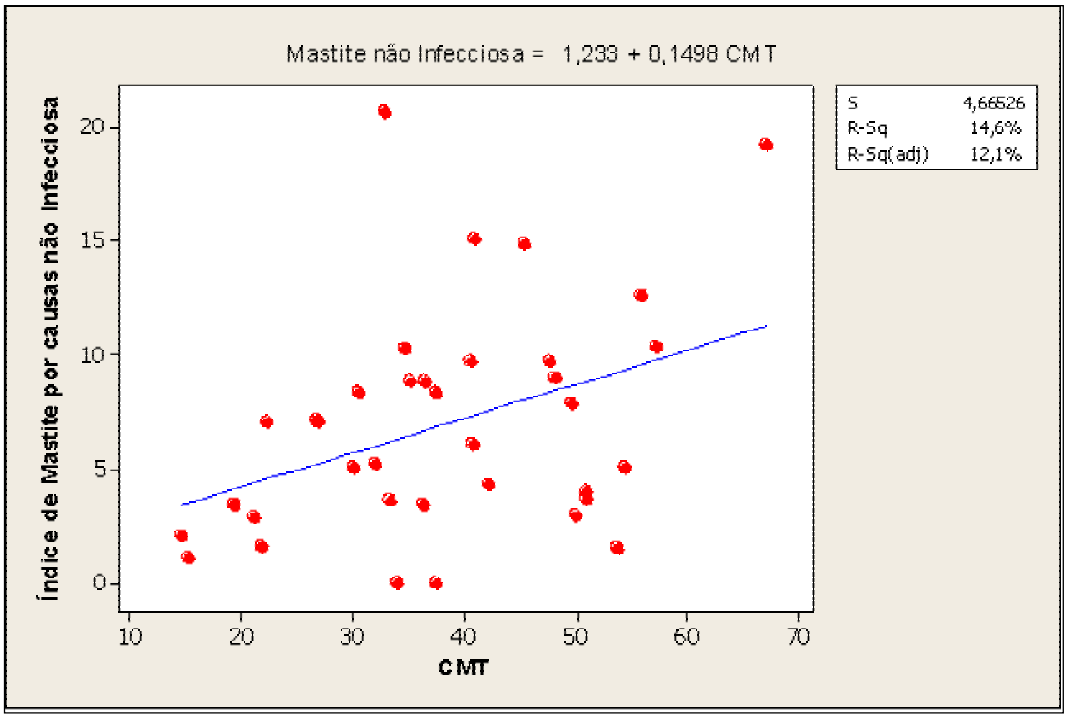

Figura 9 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste da caneca de fundo escuro e índice de mastite por causa não infecciosa

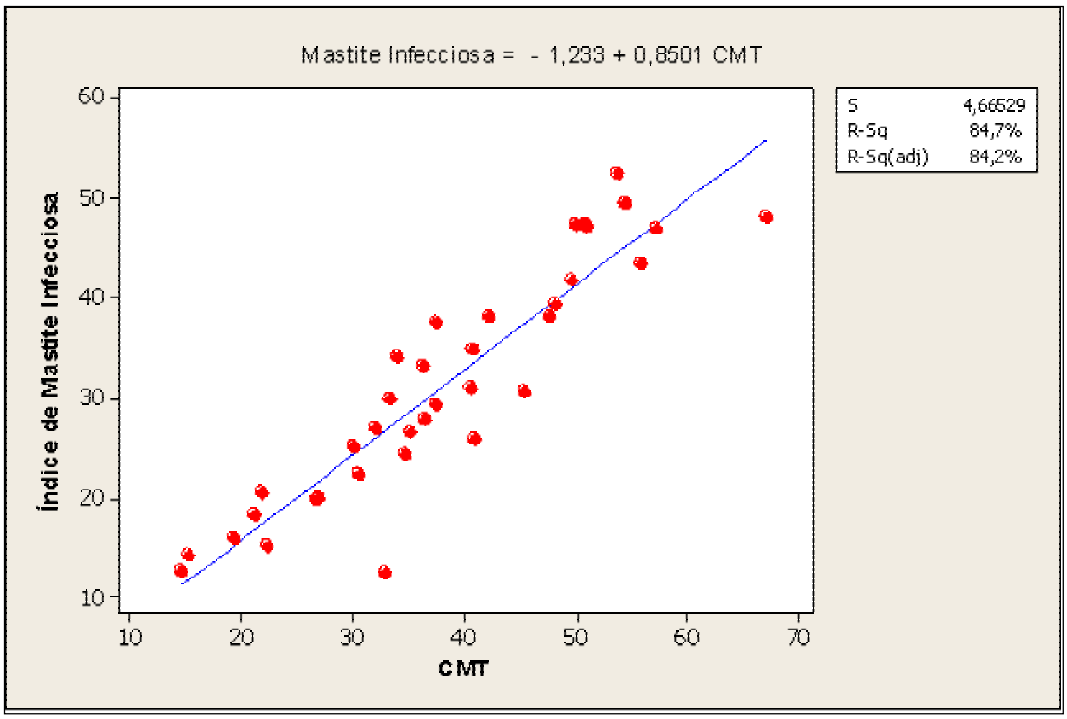

Figura 10 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite infecciosa

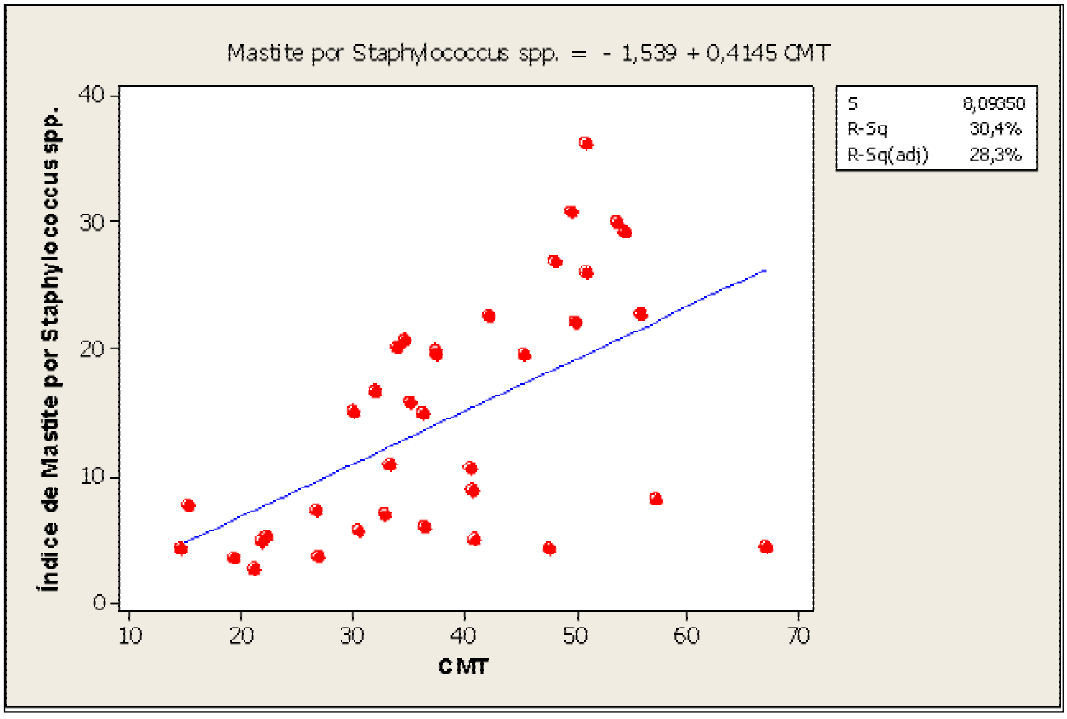

Figura 11 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Staphylococcus* spp.

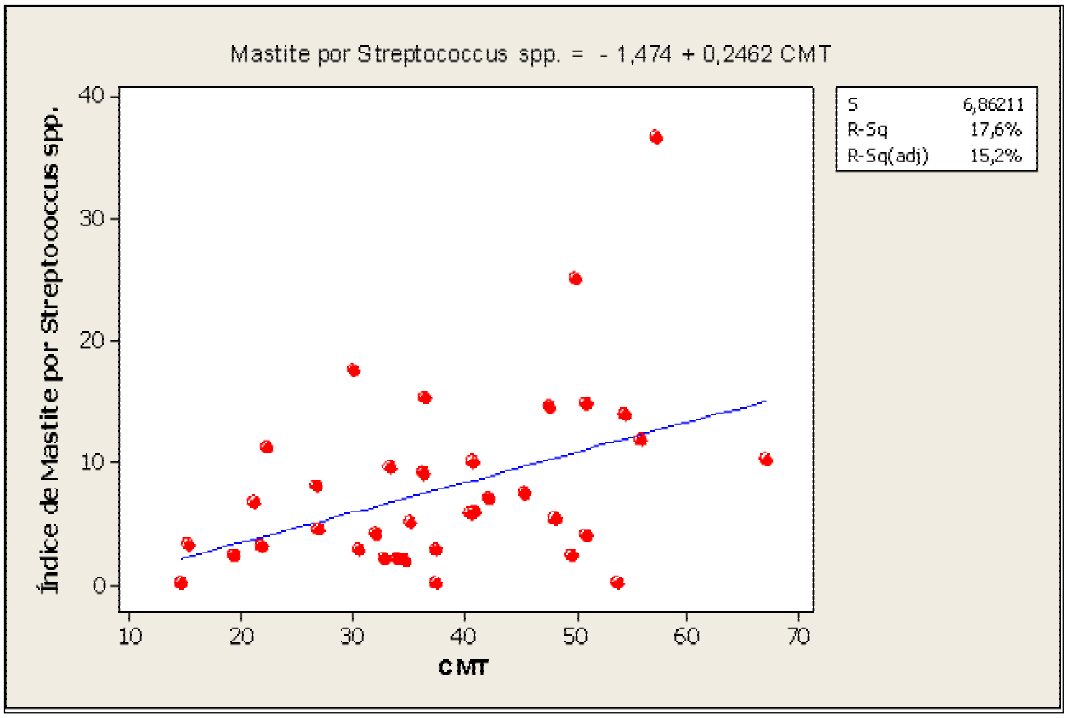

Figura 12 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Streptococcus* spp.

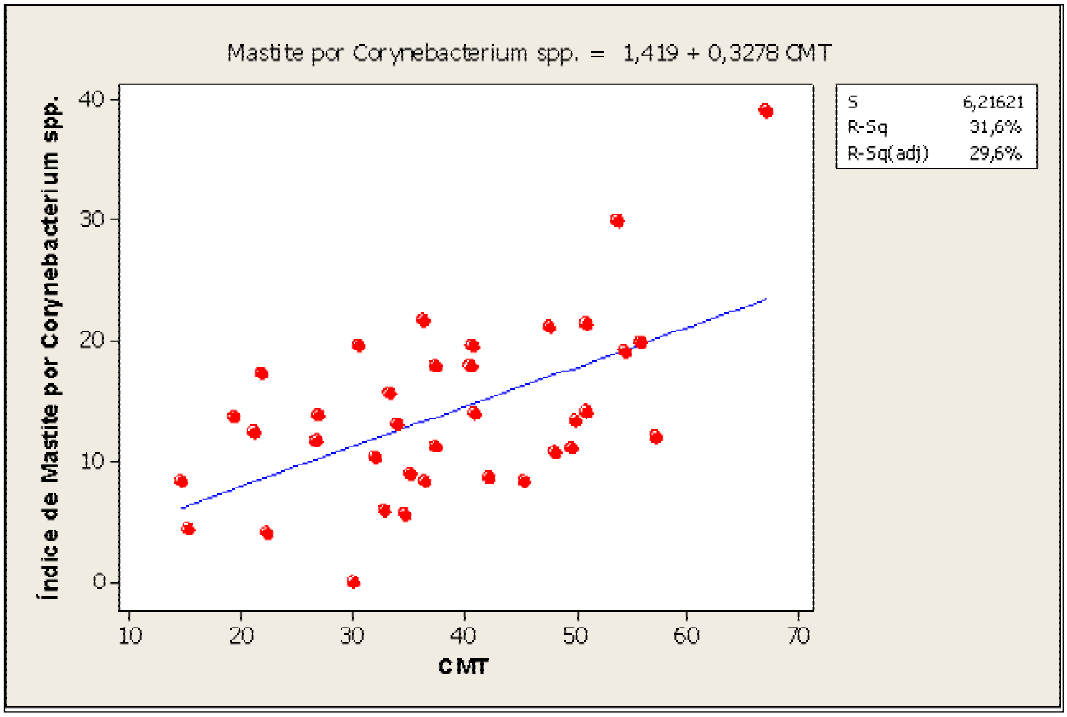

Figura 13 – Análise de Regressão Linear entre os resultados positivos ao teste CMT e índice de mastite por *Corynebacterium* spp.

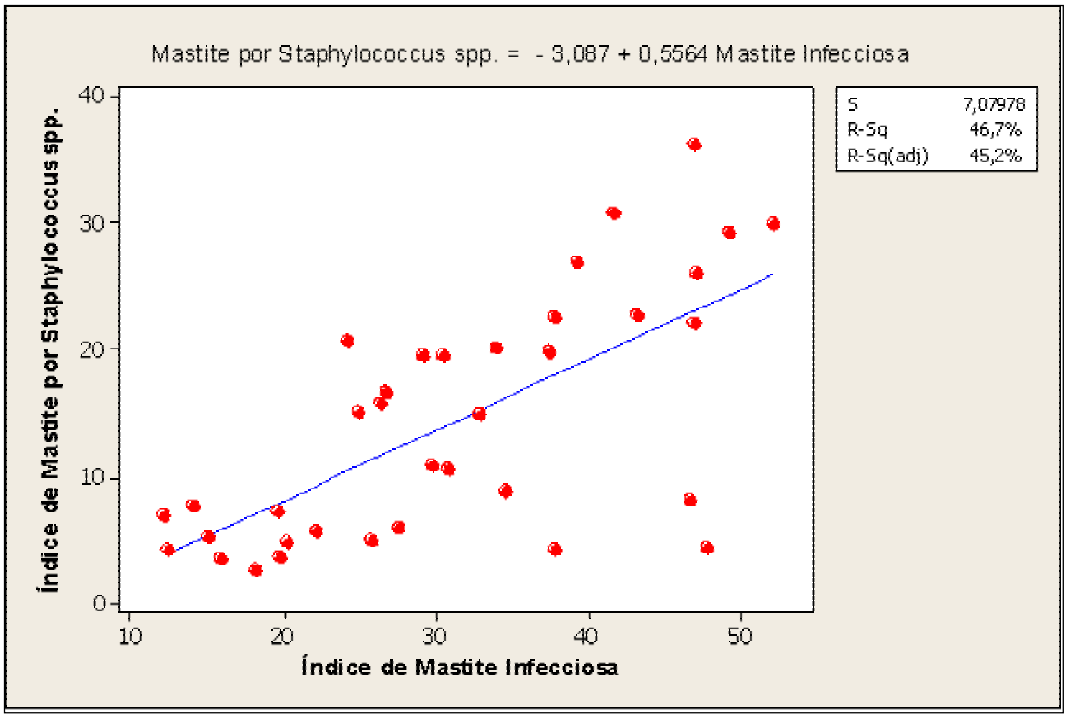

Figura 14 – Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Staphylococcus* spp.

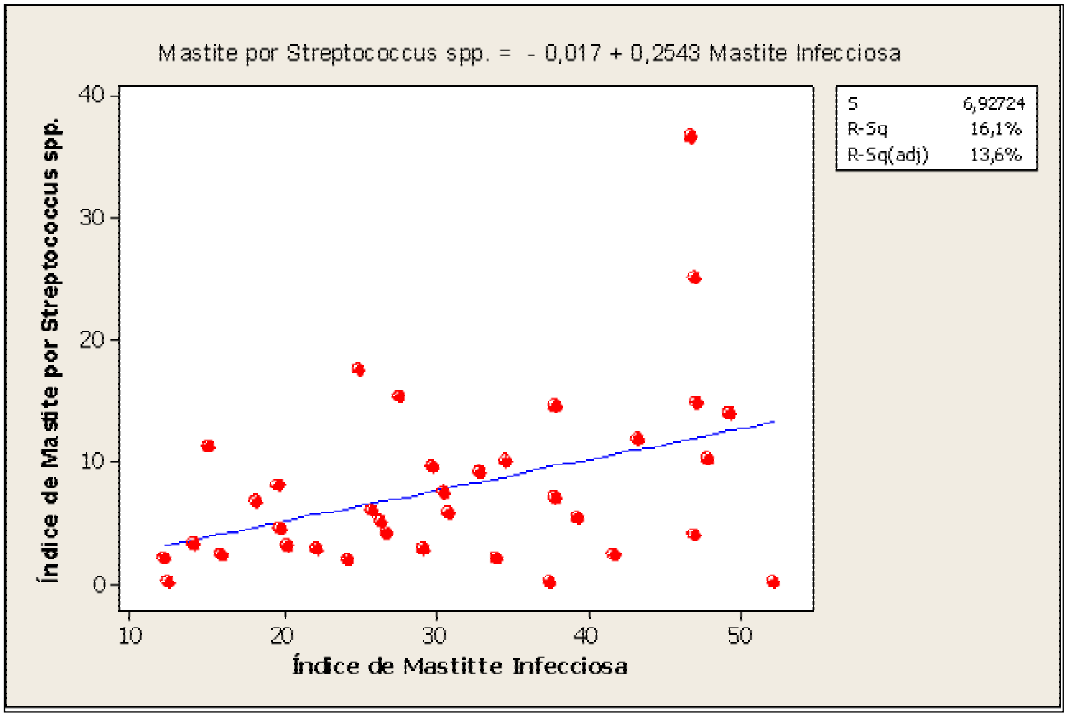

Figura 15 – Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Streptococcus* spp.

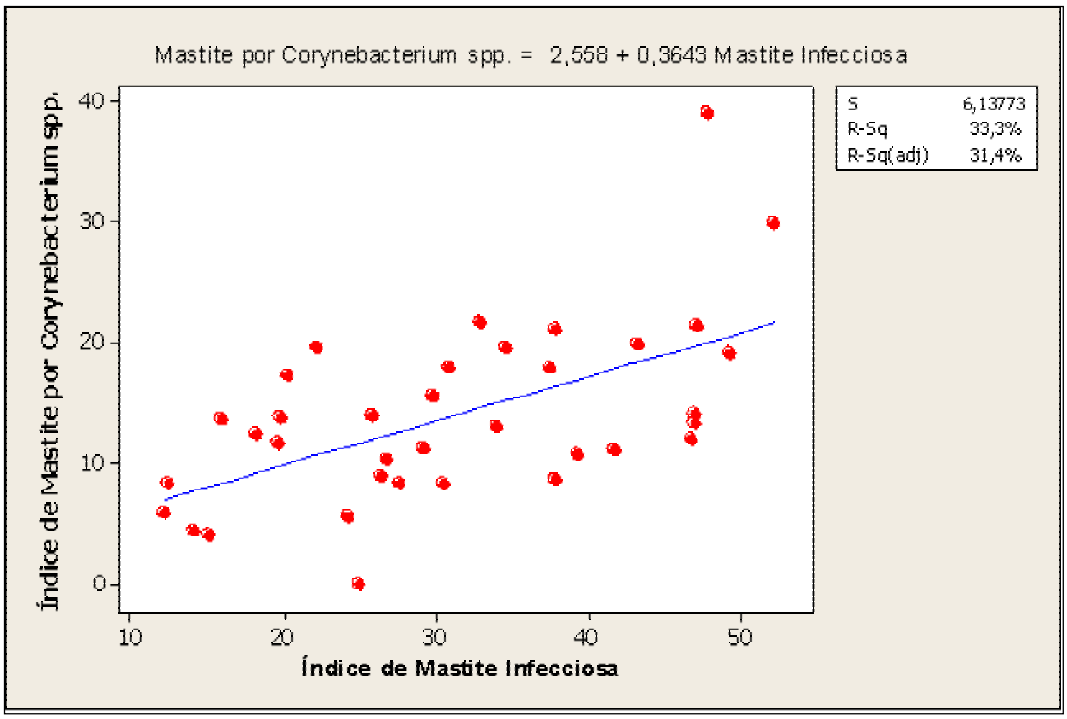

Figura 16 – Análise de Regressão Linear entre os índices de mastite infecciosa e mastite por *Corynebacterium* spp.

5.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DE MASTITE E AS DIFERENTES TÉCNICAS QUANTITATIVAS DO LEITE CRU

A tabela 5 mostra o resultado da análise de correlação entre os índices de mastite dos rebanhos leiteiros estudados e as diferentes técnicas quantitativas do leite cru, pelos resultados obtidos verifica-se que há correlação entre os índices de casos de mastite por *Staphylococcus* spp. e Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis (Figura 17), Contagem de *Corynebacterim* ssp. (Figura 18) e Contagem de Bolores e Leveduras (Figura 19).

O melhor resultado que apresentou correlação significativa foi entre o índice de casos de mastite por *Staphylococcus* spp. e Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis (r = 0,522 e R^2 = 27,3%) (Tabela 5, Figura 19).

Tabela 5 – Resultado das análises de Correlação de Pearson e Coeficiente de Determinação da Reta entre os índices de mastite e as contagens de microrganismos no leite cru, no período de agosto de 2004 a setembro de 2005, no Estado de São Paulo

Análises	r***	R^2 (%)****
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de Mesófilos	-0,076	0,6
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de Psicrotróficos	-0,037	0,1
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de Termófilos	-0,030	0,1
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de *Enterococcus* spp.	-0,055	0,3
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de *Staphylococcus* spp.	-0,068	0,5
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de *Streptococcus* spp.	0,041	0,2
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de *Corynebacterium* spp.	-0,001	0,0
Teste da Caneca de Fundo Escuro X Contagem de Bolores e Leveduras	0,090	0,8
Teste da Caneca de Fundo Escuro X NMP Coliformes Totais	0,080	0,6
Teste da Caneca de Fundo Escuro X NMP Coliformes Fecais	0,025	0,1
CMT X Contagem de Mesófilos	-0,084	0,7
CMT X Contagem de Psicrotróficos	-0,082	0,7
CMT X Contagem de Termófilos	0,192	3,7
CMT X Contagem de *Enterococcus* spp.	-0,079	0,6
CMT X Contagem de *Staphylococcus* spp.	0,036	0,1
CMT X Contagem de *Streptococcus* spp.	0,100	1,0
CMT X Contagem de *Corynebacterium* spp.	0,077	0,6
CMT X Contagem de Bolores e Leveduras	0,235	5,5
CMT X NMP Coliformes Totais	0,066	0,4
CMT X NMP Coliformes Fecais	-0,070	0,5
Mastite Infecciosa X Contagem de Mesófilos	0,113	1,3
Mastite Infecciosa X Contagem de Psicrotróficos	0,104	1,1
Mastite Infecciosa X Contagem de Termófilos	0,329	10,8
Mastite Infecciosa X Contagem de *Enterococcus* spp.	0,110	1,2
Mastite Infecciosa X Contagem de *Staphylococcus* spp.	0,213	4,5
Mastite Infecciosa X Contagem de *Streptococcus* spp.	0,217	4,7
Mastite Infecciosa X Contagem de *Corynebacterium* spp.	0,252	6,3
Mastite Infecciosa X Contagem de Bolores e Leveduras	0,340*	11,5
Mastite Infecciosa X NMP Coliformes Totais	0,220	4,9
Mastite Infecciosa X NMP Coliformes Fecais	0,054	0,3
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de Mesófilos	0,289	8,4
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de Psicrotróficos	0,276	7,6
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de Termófilos	0,522**	27,3
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de *Enterococcus* spp.	0,178	3,2
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de *Staphylococcus* spp.	0,322	10,4
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de *Streptococcus* spp.	0,279	7,8
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de *Corynebacterium* spp.	0,391*	15,3
Mastite por *Staphylococcus* spp. X Contagem de Bolores e Leveduras	0,369*	13,6
Mastite por *Staphylococcus* spp. X NMP Coliformes Totais	0,283	8,0
Mastite por *Staphylococcus* spp. X NMP Coliformes Fecais	0,064	0,4
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de Mesófilos	-0,133	1,8

Continuação tabela 5

Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de Psicrotróficos	-0,049	0,2
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de Termófilos	-0,249	6,2
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de *Enterococcus* spp.	0,089	0,8
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de *Staphylococcus* spp.	-0,016	0,0
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de *Streptococcus* spp.	0,069	0,5
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de *Corynebacterium* spp.	0,016	0,0
Mastite por *Streptococcus* spp. X Contagem de Bolores e Leveduras	0,232	5,4
Mastite por *Streptococcus* spp. X NMP Coliformes Totais	-0,005	0,0
Mastite por *Streptococcus* spp. X NMP Coliformes Fecais	-0,162	2,6
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de Mesófilos	-0,125	4,8
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de Psicrotróficos	-0,219	1,5
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de Termófilos	0,122	1,4
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de *Enterococcus* spp.	-0,120	0,6
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de *Staphylococcus* spp.	-0,075	0,6
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de *Streptococcus* spp.	-0,080	0,5
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de *Corynebacterium* spp.	-0,073	0,5
Mastite por *Corynebacterium* spp. X Contagem de Bolores e Leveduras	-0,109	1,2
Mastite por *Corynebacterium* spp. X NMP Coliformes Totais	-0,056	0,3
Mastite por *Corynebacterium* spp. X NMP Coliformes Fecais	0,075	0,6

* indica significância estatística (p<0,05)

** indica alta significância estatística (p<0,01)

*** Coeficiente de Correlação de Pearson

**** Coeficiente de Determinação da Reta

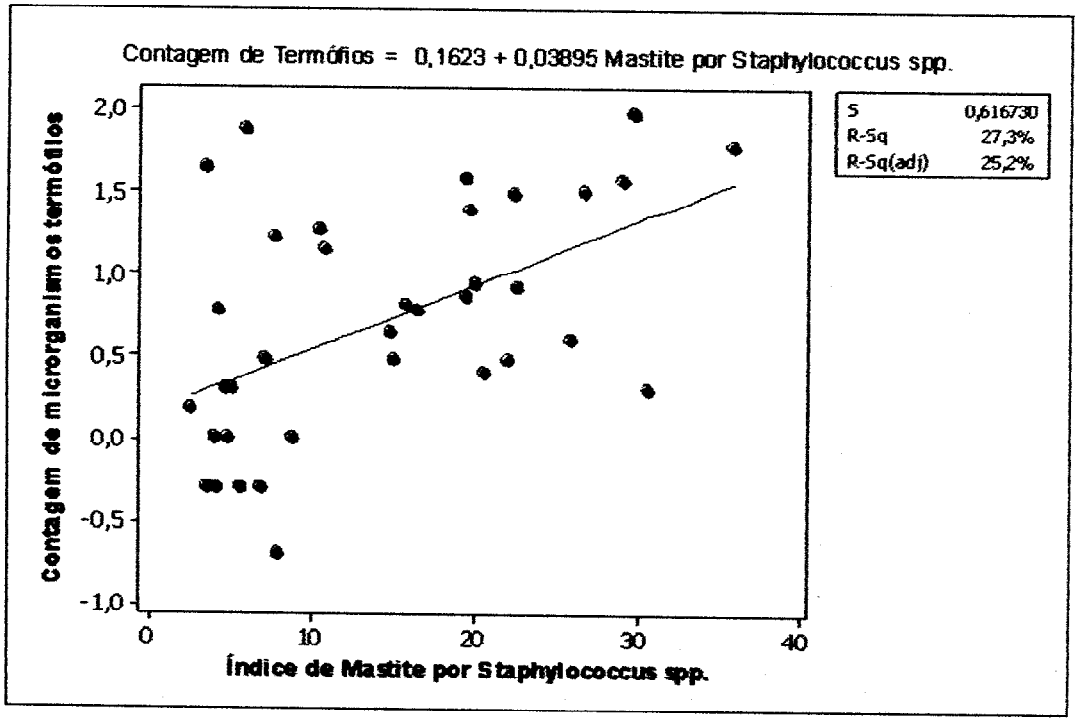

Figura 17 - Análise de Regressão Linear entre o índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de microrganismos termófilos aeróbios facultativos viáveis

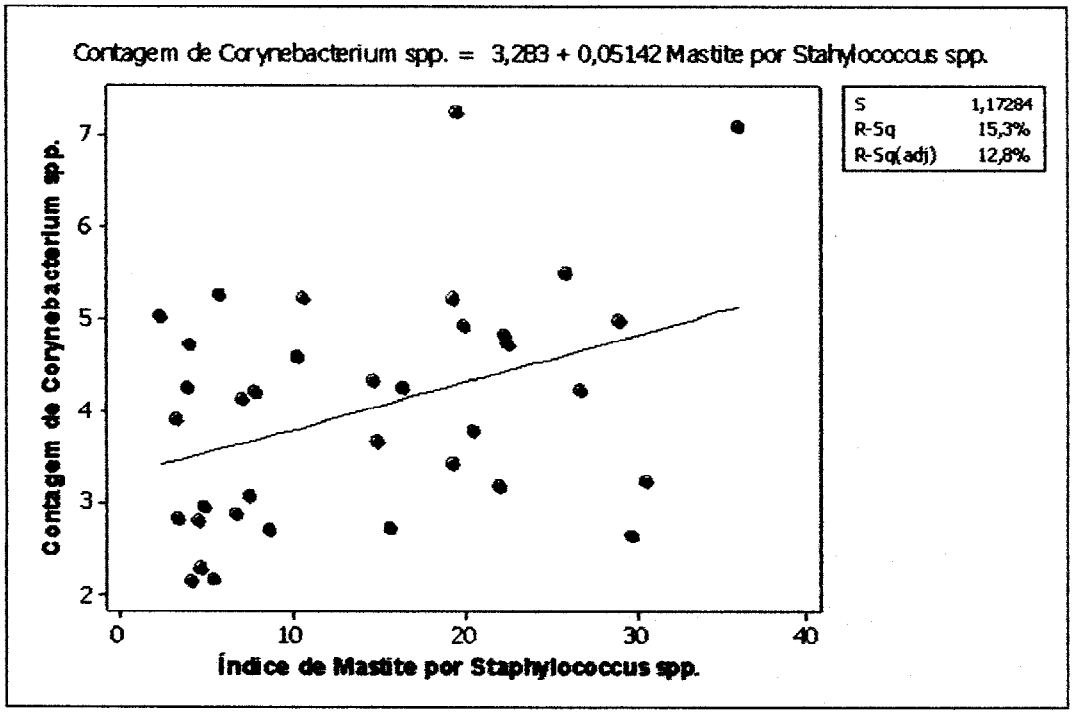

Figura 18 - Análise de Regressão Linear entre índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de *Corynebacterium* spp.

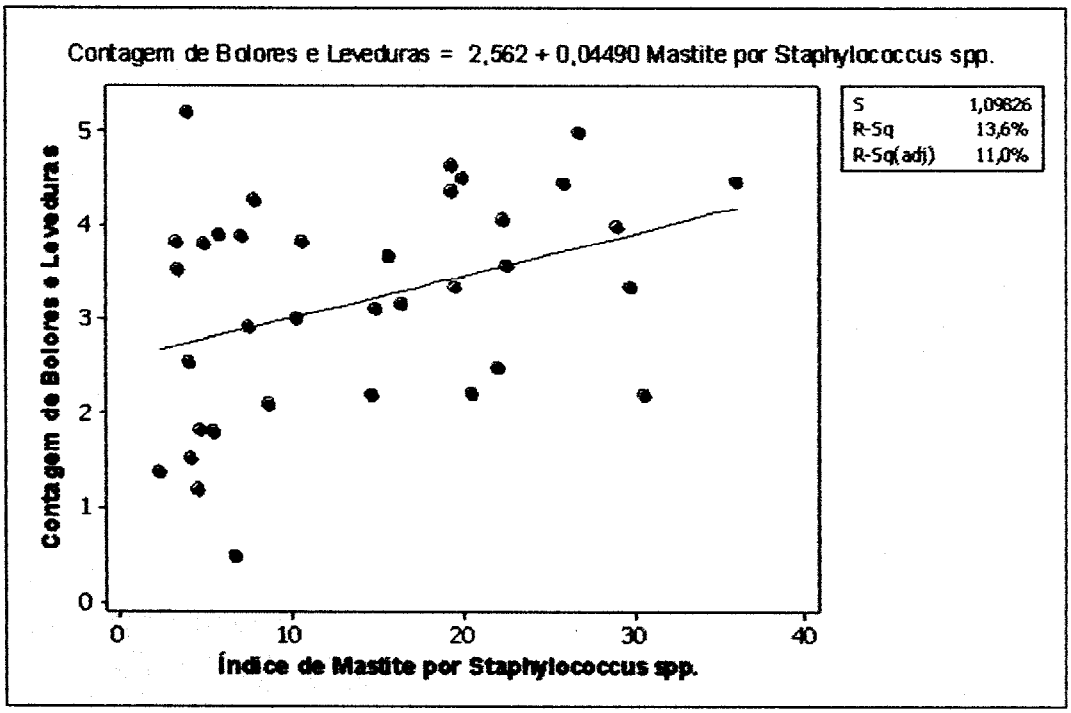

Figura 19 - Análise de Regressão Linear entre índice de mastite por *Staphylococcus* spp. e a Contagem de bolores e leveduras

6 DISCUSSÃO

Costa et al. (1986) em estudo realizado no Estado de São Paulo, Brasil, analisaram 2533 amostras de leite procedentes de 32 propriedades leiteiras e isolaram 24 diferentes gêneros de bactérias causando mastite nestes rebanhos bovinos. *Staphylococcus* spp (49,23%), *Corynebacterium* spp (30,67%) e *Streptococcus* spp (27,08%) foram os microrganismos de maior ocorrência associados ao processo inflamatório da glândula mamária. O percentual de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (4,26%) associado aos casos de mastite foi baixo, porém este grupo de microrganismos está bastante associado à contaminação do produto final, indicando falhas nas fases pós-ordenha da produção, industrialização e distribuição. Os autores destacam ainda, a presença de fungos filamentosos e leveduras (11,68%) nos casos de mastite.

Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1983) examinaram 468 vacas, de 6 propriedades rurais produtoras de leite tipo B, localizadas no município de Barretos-SP. Identificaram 11,97% das fêmeas lactantes positivas ao teste CMT e isolaram pelo menos um tipo de microrganismo de 10,26% das vacas. *Staphylococcus aureus* (52,08%), *Staphylococcus epidermis* (6,25%), *Streptococcus* spp. (58,00%) e *Escherichia coli* (2,08%) foram os agentes encontrados.

Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1984) analisaram 192 vacas em lactação, de 9 propriedades leiteiras no município de Jaboticabal-SP e verifcaram que 20,83% das fêmeas em lactação foram reagentes à prova do CMT e em 16,67% confirmou-se o envolvimento de algum agente etiológico. *Staphylococcus aureus* (38,00%), *Staphylococcus epidermidis* (18%), *Streptococcus* spp. (34,00%), *Escherichia coli* (12,00%) e *Corynebacterium pyogenes* (6,00%) foram os microrganismos envolvidos.

No presente estudo, verificou-se que os principais grupos envolvidos com mastite infecciosa são *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1983); Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1984) observaram freqüência bem mais baixa de *Corynebacterium*

spp. Costa et al. (1986) verificaram freqüência semelhante à observada neste experimento em relação aos três principais grupos de microrganismos causadores de mastite.

Tabbaa e Schenkel (1997) estudaram na Síria, três grandes rebanhos de bovinos leiteiros, testando 3.696 quartos mamários e encontraram índice de mastite subclínica, determinado pelo teste CMT de 34,2%, 43,8% e 46,1%. Os autores comentam que a maior parte da produção leiteira do país é realizada por 10 grandes fazendas.

Neste estudo, verifica-se que o índice de mastite subclínica, detectado pelo CMT na Síria, é semelhante (média aritmética de 39,12%) ao encontrado nas condições deste experimento. Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1983); Nader Filho, Shocken-Iturrino e Rossi Júnior (1984) descreveram índices menores de mastite nos municípios de Barretos-SP e Jaboticabal-SP.

Benites (1996) mostrou que há correlação entre o resultado de isolamento microbiológico de casos de mastite e a resposta inflamatória no tecido mamário (exame histopatológico) nas diferentes porções pesquisadas (parênquima, cisterna do teto e da glândula). Destaca a importância do exame microbiológico como ferramenta para o diagnóstico da mastite e levantamento epidemiológico da doença.

Della Libera (1998) descreveu que grupos de amostras de leite individuais de quartos mamários bovinos com CCS maiores de 500.000 cél./mL apresentam maior freqüência de isolamento bacteriano, principalmente associados a *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* ssp., quando comparadas com CCS abaixo de 500.000 cél./mL.

Neste experimento, a ausência de correlação entre o teste CMT e o índice de mastite não infecciosa, e a alta correlação entre o teste CMT e o resultado dos isolamentos microbiológicos (Tabela 4) demonstram que a inflamação da glândula mamária é fortemente influenciada pela invasão e colonização de microrganismos. A observação de correlação entre os casos de mastite infecciosa e casos de mastite por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (Tabela 4),

deve-se ao fato destes três grupos de microrganismos serem os principais causadores da doença (Tabela 1).

Phuektes et al. (2003) observaram analisando leite de tanques de 42 rebanhos divididos em três grupos, conforme a CCS, que *Streptococcus dysgalactiae* é encontrado com mais freqüência em rebanhos com altas contagens (> 400.000 cél./mL) do que em rebanhos com médias (200.000 a 400.000 cél./mL) e baixas (< 200.000 cél./mL). Notaram que as médias geométricas de Contagem Total de Bactérias do grupo com altas CCS eram significativamente superiores em relação aos grupos com médias e baixas CCS ($p<0,01$). Perceberam também, que as médias geométricas das Contagens de Bactérias Termodúricas do grupo com maior CCS eram significativamente superiores as dos grupos com médias e baixas CCS ($p<0,05$).

Jayarao e Wolfgang (2003) descreveram contagem padrão em placas, contagem de coliformes, contagem de *Staphylococcus aureus*, contagem de *Streptococcus agalactiae*, presença de *Streptococcus* spp. e de *Staphylococcus* coagulase negativa como importantes testes feitos nos tanques de resfriamento para monitoramento de mastite em rebanhos leiteiros. Chamam a atenção para o fato de que se fazer análise do tanque de resfriamento para diagnóstico e monitoramento definitivo da saúde do rebanho, é mais econômico e rápido que testar amostras individuais ou de grupos de animais. Alertam que para a determinação do *status* sanitário de um rebanho a partir do tanque de resfriamento, é necessário que se faça a coleta e análise de várias amostras (pelo menos 4 amostras durante 4 meses), num período inferior a 36 horas após o término da ordenha.

Veiga (2001) descreveu: “É indispensável que o leite seja produzido por vacas sadias, que não estejam eliminando através do leite microrganismos prejudiciais à saúde humana, com resíduos de antibióticos ou outras drogas”. Alertou para os cuidados com a higiene do processo de obtenção, armazenamento e transporte do leite cru.

Silva, Portugal e Castro (1999) disseram que a mastite pode prejudicar a qualidade do leite, provocando alterações em sua composição. Chamaram a atenção para que

a falta de controle da doença pode causar danos à saúde do consumidor, devido à presença de bactérias patogênicas e/ou produtoras de toxinas, e por ingestão de resíduos de antibióticos e/ou quimioterápicos no leite, provenientes de tratamentos dos animais doentes.

Fonseca, Santos e Pereira (2001) descreveram a qualidade microbiológica do leite como indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho e das condições gerais de manejo e higiene na propriedade leiteira. Destacaram que o termo qualidade microbiológica pode ser enfocado sob dois aspectos: qualidade industrial e risco à saúde pública. Indicaram quatro fatores determinantes que influenciam a carga microbiana inicial do leite armazenado no tanque resfriador: carga micobiana dentro do próprio úbere (saúde da glândula mamária), higiene de ordenha (limpeza e desinfecção da superfície dos tetos), condições de higienização dos utensílios e equipamentos de ordenha, e a qualidade da água utilizada em todo o processo de ordenha.

Brito e Brito (2001) relataram a necessidade de se aumentar a vida de prateleira dos produtos lácteos para atingir a expectativa de qualidade do consumidor. Para isso, indicam a necessidade da redução da carga microbiana do leite produzido no Brasil, e os cuidados com a higiene, armazenamento e transporte em toda a cadeia de produção, industrialização e comercialização. Descreveram que a contaminação do leite na ordem de 100 a 1.000 UFC/mL é praticamente inevitável, por esses microrganismos estarem presentes no interior do úbere ou na cisterna do teto. Sob condições adequadas de ordenha, encontra-se contagem de aproximadamente 10.000 UFC/mL pela presença de bactérias na superfície da teta e nos equipamentos usados na ordenha. Mostraram que sob condições adequadas de estocagem (temperatura de 4ºC), a carga microbiana pode ser mantida entre 10.000 e 100.000 UFC/mL.

Neste estudo, observou correlação entre o índice de mastite por *Staphylococcus* spp. com Contagem de microrganismos termófilos viáveis facultativos, Contagem de *Corynebacterium* spp. e Contagem de bolores e leveduras (Tabela 5). Apenas essas três contagens são influenciadas pelo índice de mastite e ainda assim o grupo de microrganismo isolado dos casos de infecção da glândula mamária parece ter

relação apenas com um dos meios seletivos utilizados para a quantificação de microrganismos no leite cru (Contagem de *Corynebacterium* spp.). Phuektes et al. (2003) utilizaram metodologia em que estabelecem relação entre os casos de mastite e a presença de microrganismos no leite cru pelo isolamento de espécies que infectam a glândula mamária no produto final. O fato de se isolar um agente causador da mastite no leite cru, não pode ser fato indicativo de influência na contagem, por este grupo de microrganismos no produto final. Jayarao e Wolfgang (2003) descreveram associação entre o *status* sanitário do rebanho e a quantidade de grupos de microrganismos causadores de mastite no leite cru, quando analisadas várias amostras por um período espaçado de tempo. Fonseca, Santos e Pereira (2001), Veiga (2001) destacam a importância do controle da mastite para a garantia da melhor qualidade do leite.

Souto et al. (2005b) compararam dois sistemas de ordenha mecânica: circuito fechado e balde ao pé. Foi feita a comparação entre as Contagens médias de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de leite e demonstraram que não houve diferença significativa (valor de p = 0,1877) entre os dois métodos de ordenha estudados. Concluem que o Sistema de Ordenha Mecânico empregado em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo, não garante a obtenção de um leite com boa qualidade microbiológica.

Brandão (2000) alertou para a necessidade da implantação de sistemas de gestão de garantia da qualidade para a segurança alimentar e melhor controle da ocorrência de doenças de origem alimentar.

Este trabalho mostra que os índices de mastite dos quartos mamários em produção não influenciam significativamente a quantidade de microrganismos no leite *in natura*. Fatores ligados à higiene de ordenha e manejo de rebanho devem influenciar muito mais a qualidade microbiológica do leite cru que os casos de processos inflamatórios da glândula mamária presentes no rebanho leiteiro bovino, nas condições estudadas. Para se produzir uma matéria-prima de melhor qualidade, deve-se direcionar o foco de ação para a melhoria das condições higiênico-sanitárias leite cru, para cuidados com higiene de ordenha, condições de armazenamento e transporte do produto.

Apesar de, nas condições do experimento, a mastite não ter importante influência na contaminação do leite, não significa que não tenha importância. Em situações em que não se tenha uma variação tão grande no número de microrganismos no leite cru e se tenham baixas contagens como critérios de classificação, pode ser que o índice de mastite do rebanho influencie a qualidade microbiológica do leite cru. É importante lembrar ainda, que o alto índice de mastite, provoca perda de qualidade dos nutrientes do leite, pela alteração da permeabilidade do tecido mamário, e que a presença da doença em rebanhos leiteiros bovinos desencadeia sérios prejuízos econômicos, podendo inviabilizar a atividade exploratória leiteira.

O monitoramento do *status* de saúde da glândula mamária, analisando-se amostras de leite do tanque de refrigeração em propriedades leiteiras no Estado de São Paulo, não é eficiente nas condições estabelecidas nesta pesquisa, fazendo-se necessário, a análise individual de cada quarto mamário para o efetivo controle da mastite em rebanhos leiteiros bovinos.

7 CONCLUSÕES

- Os índices de mastite encontrados neste trabalho são semelhantes aos verificados em outros estudos, no Estado de São Paulo.

- As diferentes técnicas quantitativas de análise do leite cru apresentam grande variação entre as propriedades.

- Os casos de mastite são fortemente influenciados pela ação de agentes infecciosos.

- O índice de mastite em rebanhos leiteiros bovinos não influencia a qualidade microbiológica do leite cru, nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4. ed. Washington: APHA, 2001, 676 p.

ASHWORTH, U. S.; FORSTER, T. L.; LUEDECKE, L. O. Relationship between californian mastitis test reaction and composition of milk from opposite quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 7, p. 1078-1082, 1967.

BARROS, V. R. M. Estudo de fatores de patogenicidade de Bacillus spp isolado em leite UHT. 2004. 117f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BENITES, N. R. **Estudo dos aspectos microbiológicos e histopatológicos da mastite infecciosa bovina.** 1996. 169 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BENITES, N. R.; COSTA, S. S.; MELVILLE, P. A. Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Corynebacterium* sp presentes no leite de vacas com mastite subclínica associada a estes microrganismos. **Arquivos Inst. Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 43, 2002. Suplemento.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Veterinary medicine**. 7. ed., London: Baillière Tindall, 1991, p. 501-59.

BOLGOV, A. E.; KARMANOVA, E. P.; MAKAROVA, V. E.; MURAVIYA, L. N. Influence of udder and factors of milking on mastitis sick rate in cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL HYGIENE, 9., 1997, Helsinki. **Anais…** Helsinki: University of Helsinki, Departament of Clinical Veterinary Science, Section of Animal Hygiene, v. 1, 1997, p. 80-83.

BOTTINO, J. A.; HIPÓLITO, O. Freqüência e incidência de amostras de *Escherichia coli* consideradas enteropatogênicas para gastroenterite infantil isoladas de mastite bovina. **Atualidades Veterinárias**, v. 2, n. 9, p. 44, 1973 (Resumo da XXVIII Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária).

BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍSIO, F. L.; PEREIRA, M. L.; GARINO JR, F.; COSTA, E. O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 3, p. 4-11, 1999.

BRANDÃO, S. C. C. Segurança alimentar com foco no consumidor final. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil:** qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora: Embrapa, 2001, p. 39-46.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Decreto Nº 30.621 de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, p. 10785, 07 de jul. 1952. Seção 1. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=9127> Acesso em: 06 mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 21005, 19 de set. 1997. Seção 1. <Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do> Acesso em: 06 mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 13, 21 de set. 2002. Seção 1.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Problemas para produção de leite de qualidade. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil:** qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora: Embrapa, 2001, p. 53-67.

BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N.; BRITO, M. A. V.; ARCURI, E. F.; PINTO, S. M.; CAMPELO, J. C. Estruturação de um programa de treinamento para produção de leite seguro: o exemplo do Programa Alimentos Seguros/Campo – segmento leite. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF, 2004, p. 178-182.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF, 2004, p. 317-331.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 848-854, 2005.

COSTA, E. O. Leite, problema cultural! **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 4, p. 2, 1999a (editorial).

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, fascículo 1, v. 1, p. 003-009, 1998a.

COSTA, E. O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B. Proporção da ocorrência de mastite clínica e subclínica correlacionada aos principais agentes etiológicos. **Revista NAPGAMA**, v. 4, n. 3, p. 10-13, 2001.

COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 107-112, abr./jun., 1986.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* spp. **Revista NAPGAMA**, v. 1, n. 1, p. 9-10, 1998b.

COSTA, E. O.; SILVA, J. A. B.; RIBEIRO, M. G.; SILVA, E. O. T. R. Resistência à pasteurização rápida e lenta de cepas de *Nocardia asteroides* isoladas de casos de mastite clínica e subclínica. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 4, p. 13-16, 1999b.

CRUZ, J. C. M.; MOLINA, L. R.; BRITO, J. R.; CUNHA, R. P. L.; BRITO, M. A. V.; SOUZA, G. N. Eficiência da blitz terapia na erradicação de *Stretptococcus agalactiae* e controle de *Staphylococcus aureus* em rebanhos bovinos leiteiros. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V**. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF, 2004, p. 136-140.

CULLOR, J. S.; TYLER, J. W. Mammary gland health and disorders. *In:* SMITH, B. P. **Large animal internal medicine:** disease of horses, cattle, sheep, and goat. 2. ed., St. Louis: Mosby-Year Book, cap. 34, 1996, p. 1177-1197.

DANIEL, R. C. W.; BIGGS, D. A.; BARNUM, D. A. The relationship between california mastitis test score and monthly milk production and composition. **Canadian Veterinary Journal**, v. 7, n. 5, p. 99-105, 1966.

DELLA LIBERA, A. M. M. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas com alta contagem de células somáticas.** 1998. 79f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

EDWARDS, S. J. *A seletive medium for the diagnosis of Streptococcus mastitis*. **Jounal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 46, n. 4, p. 211-217, 1933.

FARIA, J. L. **Anatomia Patológica:** parte geral. v. 1, Campinas: Universidade de Campinas, 1971, cap. 3, p. 69-121.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V.; PEREIRA, C. C. Qualidade higiênica do leite: efeitos sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil:** qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora: Embrapa, 2001, p. 141-161.

GEBLER, A.; PUCHAJDA, Z.; CZAPLICKA, M. The importance of diagnostics in preventing mastitis in cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL HYGIENE, 9., 1997, Helsinki. **Anais…** Helsinki: University of Helsinki, Departament of Clinical Veterinary Science, Section of Animal Hygiene, v. 1, 1997, p. 96-98.

GOMES, F. P. **Iniciação à estatística.** 6. ed., São Paulo: Nobel, 1978, 211 p.

HANWAY, W. H.; HANSEN, A. P.; ANDERSON, K. L.; LYMAN, R. L.; RUSHING, J. E. Inativation of penicillin G in milk using hydrogen peroxide. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 466-469, 2005.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3. ed. Academic Press: San Diego, 1998., 532 p.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. Identification and characterization of elevated microbial count in bulk tank raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 292-298, 2001.

HILLERTON, J. E. Redefining mastitis based on somatic cell count. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 345, p. 4-6, 1999.

JAYARAO, B. M.; WOLFGANG, D. R. Bulk-tank milk analysis: a useful tool for improving milk quality and herd udder health. **The Veterinary Clinics: Food Animal Pratice**, v. 19, p. 75-92, 2003.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastitis Test (CMT)* e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KREEGER-VAN-RIJ, N. J. W. **The yeast:** a taxonomic study. 3. ed. Amsterdan: Elsevier Science Publisher, 1984, 41 p.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore : Willians & Wilkins, 1994, 984 p.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* enterotoxins. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA, 2001, cap. 39, p. 387-403.

LANGONI, H.; FONSECA, T. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina. Importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 50, p. 36-38, 1997a.

LANGONI, H.; MACHADO, G. J.; SAVOLDI, F.; CAMARGO, M. J. B. *Campylobacter* sp como agente de mastite bovina: aspectos de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 50, p. 42-44, 1997b.

LANGONI, H.; TONIN, F. B.; CABRAL, K. G.; CAVALIERO, M. J. Tratamento da mastite bovina com a associação ampicilina+cloxacilina. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 3, p. 21-23, 1999.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bomexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista NAPGAMA**, v. 3, n. 1, p. 04-07, 2000a.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; SILVA, A. V.; SOUZA, L. C.; SHIMABUKURO, F. H.; CAUDURO, R. O. Eficácia da cefapirina benzatina no tratamento da mastite bovina subclínica na interrupção da lactação. **Revista NAPGAMA**, v. 3, n. 3, p. 07-09, 2000.

LANGONI, H.; PULGA, M. E.; DOMINGUES, P. F.; SILVA, A. V. Eficácia da enrofloxacina no tratamento de casos de mastite bovina de origem ambiental em propriedades leiteiras. **Revista NAPGAMA**, v. 4, n. 1, p. 19-22, 2001.

LENNETE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149 p.

LODDER, L. **The yeasts:** taxonomic study. 2. ed. Amsterdan: North Holland Publishing Co., 1970, 48 p.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 264-274, 2000.

McKENZIE, D. A. *The use of thallium acetate glucose broth in the diagnosis of Streptococcus mastitis*. **The Veterinary Record**, v. 53, n. 33, p. 473-480, 1941.

MEIRELES, A. J. **Planejamento, qualidade e globalização na indústria de laticínios:** 1997-2000 – um olhar incompleto. São Paulo : Cultura Editores Associados, 2000, cap. 8, p. 109-118.

MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; SINHORINI, I. L.; COSTA, E. O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v. 0, p. 1-7, 2002.

MINITAB® Realease 14, Minitab Inc, State College, PA, USA.

MURPHY, S. C.; CRANKER, K.; SENYK, G. F.; BARBANO, D. M.; DAEMAN, A. I.; GALTON, D. M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 620-626, 1989.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.; TENOVER,F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999, 1773 p.

NADER FILHO, A.; SCHOCHEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Mastite clínica em rebanhos produtores de leite tipo B. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 35, n. 5, p. 621-630, 1983.

NADER FILHO, A.; SCHOCHEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 36, n. 5, p. 549-558, 1984.

NEMETH, J.; MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. In vitro comparation of bovine matitis and fecal *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 231-238, 1994.

NERO, L.A.; FRANCO, B. D. G.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa nº 51. *In:* DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF, 2004, p. 189-194.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 361-366, 1984.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas na região Nordeste do Rio Grande do Sul: 1. células somáticas. *In:* DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo : UPF, 2004, p. 141-145.

OPEN OFFICE 2.0 Calc, SunMicrosystems, BrOffice.org, 2005. Disponível em: <http://www.openoffice.org.br/produto>. Acesso em: 10 jan. 2006.

PANETTA, J. C. Avaliação de algumas características físico-químicas e microbiológicas de leites beneficiados, distribuídos ao consumo na cidade de São Paulo durante o verão de 1997. 1977. 124f. Tese (Livre-Docência em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

PARKER, W. H. **Manejo de los animals:** salud y enfermedad. 2. ed. Barcelona: Aedos, 1981, cap. 15, p. 253-265.

PHILPORT, W. N. Influence of subclinical mastitis on milk production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 6, p. 978, 1967.

PHUEKTES, P.; BROWNING, G. F.; ANDERSON, G.; MANSELL, P. D. Multiplex polumerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 149-155, 2003.

QUINN, T. **Dairy farm management.** New York: Litton Educational Publishing, 1980, cap. 35, p. 423-433.

RAIA, R. B.; COSTA, E. O.; GARINO Jr., F.; WATANABE, E. T.; THIERS, F. O.; GROFF, M. R. Estudo da persistência de eliminação de resíduo de antibióticos no leite após tratamento sistêmico e intramamário de mastite. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 1, p. 04-08, 1999.

RANDOLPH, H. E.; ERWIN, R. E. Influence of mastitis on properties of milk X fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n.8, p. 865-868, 1974.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000, cap. 8, p. 309-377.

RIBEIRO, A. R.; GARINO JR, F.; SILVA, J. A. B.; WATANABE, E. T.; VALLE, C. R.; COSTA, E. O. Influência da sazonalidade na ocorrência de mastite bovina por microrganismos ambientais. **Revista NAPGAMA**, v. 4, n. 4, p. 10-14, 2001.

ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional.** Rio de Janeiro : Interamericana, 1974, cap. 3, p. 51-96.

ROGERS, S. A.; MITCHELL, G. E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing propertiers of bulk milk – 6. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Tecnology**, v. 49, p. 70-74, 1994.

RUEGG, P. L.; TABONE, T. J. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell count in Wisconsin dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2805-2809, 2000.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÂMMILER, C.; ZSCHÔCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. Journal of Dairy Science, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003a.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D. M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1601-1607, 2003B.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SCHUKKEN, Y. H.; GROMMERS, F. J.; GEER, D. V.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. **The Veterinary Record**, v. 15, p. 60-63, 1989.

SENYK, G. F.; GOODALL, C.; KOZLOWSKI, S. M.; BANDLER, D. K. Selection of tests for monitoring the bacteriological quality of refrigerated raw milk supplies. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 3, p. 613-619, 1988.

SÉRIEYS, F.; RAGUEL, Y.; GOBY, L.; SCHIMIDT, H.; FRITON, G. Comparative efficacy of local antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastits. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 93-99, 2005.

SILVA, E. O. T. R. **Leite longa vida integral:** avaliação de alguns parâmetros de qualidade dos leites cru e processado. 2001. 122 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, N.; CARDOSO, H. F. T.; SENA, M. J.; CARMO, L. S. Produção de toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 5, p. 12-14, 1999.

SILVA, P. H. F.; PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D. **Qualidade e competitividade em laticínios.** Juiz de Fora: EPAMIG, 1999, cap. 4, p. 39-45.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. A World for milk somatic cell count: Is it justified? **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 345, p. 7-10, 1999.

SOUNIS, E. **Bioestatística:** princípios fundamentais, metodologia, estatística, aplicação às ciências biológicas. 2. ed. (rev.), São Paulo : McGraw-Hill do Brasil, 1975, 230 p.

SOUTO, L.I.M.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; GARINO, J.R.F. Surto de *Nocardia* spp. isoladas de casos de mastite em uma propriedade leiteira no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo-RS, **Anais...**, Passo Fundo, 2004 (CD-ROM).

SOUTO, L. I. M.; GARBULHO, M. A.; MELVILLE, P. A.; MERSEGUEL. C. E. B.; MINAGAWA, C. Y. ; SAKATA, S. T. ; BENITES, N. R. Contagem Padrão em Placas (CPP) de microrganismos mesófilos em leite cru de propriedades leiteiras no Estado de São Paulo, Brasil. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2., CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS,

8., 2005a, Búzios-RJ, **Anais...** São Paulo: Encarte eletrônico da Revista Higiene Alimentar: v. 19, n. 130,2005a (CD-ROM).

SOUTO, L. I. M.; GARBULHO, M. A.; MERSEGUEL. C. E. B.; MINAGAWA, C. Y. ; SAKATA, S. T. ; BENITES, N. R. Comparação entre dois tipos de ordenhas em propriedades produtoras de leite no Estado de São Paulo, Brasil. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2., CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 8., 2005b, Búzios-RJ, **Anais...** São Paulo: Encarte eletrônico da Revista Higiene Alimentar: v. 19, n. 130,2005b (CD-ROM).

SOUTO, L. I. M.; GARBULHO, M. A.; GONÇALVES, F.; MERSEGUEL. C. E. B.; MINAGAWA, C. Y. ; SAKATA, S. T. ; BENITES, N. R. Contagem de Bolores e Leveduras de leite cru coletados em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil. CONGRESSO BRAILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005c, Santos-SP, **Anais...**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005c (CD-ROM).

SOUTO, L. I. M.; GARBULHO, M. A.; GONÇALVES, F.; MERSEGUEL. C. E. B.; MINAGAWA, C. Y. ; SAKATA, S. T. ; BENITES, N. R. Contagem de Enterococcus spp de leite cru coletados em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil. CONGRESSO BRAILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23.,2005d, Santos-SP, **Anais...**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005d (CD-ROM).

SPEXOTO, A. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVAL, A. A. Aplicação do sistema de análise de perigos em pontos críticos de controle em propriedades leiteiras tipo A. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1424-1430, 2005.

SPINELLI, W.; SOUZA, M. H. **Introdução à estatística.** São Paulo: Ática, 1990, 160 p.

STOKES, E. J.; RIDGWAY, G. L.; WREN, M. W. D. **Clinical Microbiology.** 7. ed. Edward Arnold: London, 1993, p. 66-69.

TABBAA, D.; SCHENKEL, F. Influence of the management system on the development of sub-clinical mastitis in dairy farms in Syria. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL HYGIENE, 9., 1997, Helsinki. **Anais…** Helsinki: University of Helsinki, Departament of Clinical Veterinary Science, Section of Animal Hygiene, v. 1, 1997, p. 149-154.

THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; COSTA, E. O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste “Califórnia Mastitiis Test” (CMT) no leite de vacas. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 4, p. 9-12, 1999.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1983, cap. 4 e 7, p. 144-250 e 371-390.

U. S. Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual* (*On line*). jan. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html> acesso em: 20 ago. 2002.

VASIL, M.; VENGLOVSKÝ, J. Reduction of mastitis occurrrence in a dairy cow herd using combined anti-mastitis methods. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL HYGIENE, 9., 1997, Helsinki. **Anais…** Helsinki: University of Helsinki, Departament of Clinical Veterinary Science, Section of Animal Hygiene, v. 1, 1997, p. 159-162.

VEIGA, V. M. O. Saúde animal: ponto de partida para obtenção de um leite com qualidade. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil:** qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora: Embrapa, 2001, p. 7-19.

WEAVER, J. C.; KROGER, M. Protein, casein, and noncasein protein percentages in milk with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 6, p. 878-881, 1977.

ZAFALON, L. F.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. A.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. A. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção Láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Revista NAPGAMA**, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 345, p. 15-18, 1999.